

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SHEYLA MAYUMI KUNIWAKE

Gene *HLA-G*: polimorfismo em populações e na doença autoimune pênfigo foliáceo

CURITIBA

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SHEYLA MAYUMI KUNIWAKE

Gene *HLA-G*: polimorfismo em populações e na doença autoimune pênfigo foliáceo

Monografia apresentada à disciplina  
Estágio II - Genética (BG015) como  
requisito parcial à conclusão do curso  
de Ciências Biológicas, Setor de  
Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza  
Petzl-Erler

CURITIBA

2011

“O que eu ouço, esqueço.  
O que eu vejo, lembro.  
O que eu faço, aprendo.”

Confúcio

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Ser divino e aos meus pais, que fizeram com que minha vida fosse possível. Obrigada por acreditarem em mim e me darem essa oportunidade!

Às minhas irmãs, por todo o apoio e carinho...

Às minhas “velhas” amigas Raquel e Adriana. Não há distância que possa nos separar!

À Elenice, por ser a responsável por muitas noites de diversão em Curitiba. Agradeço muito a sua amizade!

Ao meu namorado San-san, por todo o carinho, companheirismo, exemplo e auxílio. Você me ajuda a ser uma pessoa melhor e mais feliz. Te adoro!

Aos colegas de laboratório, por todos os conselhos, discussões e inspirações. Aprendo muito com vocês, sigo seus exemplos, e tudo isso é de grande valia para mim! Admiro muito todos vocês!

Ao Ricardo, pela paciência em ensinar os protocolos e algumas análises de seu trabalho, por me permitir ajudá-lo e por ter me ajudado mesmo estando longe. Torço muito por você!

Ao Valter, pela paciência em sequenciar todas as minhas amostras!

À professora Maria Luiza, pela orientação bem dedicada que é quase uma lenda. Obrigada pela confiança e oportunidade! Você é um grande exemplo a ser seguido!

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

## RESUMO

*HLA-G* é um gene *HLA* de classe I não-clássico que codifica uma molécula que está envolvida em importantes funções imunomoduladoras, como a inibição da citotoxicidade de células NK e linfócitos T CD4+ e T CD8+. Por isso, tem uma função de destaque no contexto da gravidez, e também pode exercer papéis em transplantes, câncer, doenças virais, inflamatórias e autoimunes. Devido à importância dessa molécula na resposta imune, estudos populacionais do gene *HLA-G* auxiliam a compreensão de sua variabilidade alélica, bem como para entender a origem e dinâmica de seus polimorfismos. Este trabalho visa verificar a existência ou não de associação de genótipos e alelos de *HLA-G* com o pênfigo foliáceo, e também caracterizar a diversidade alélica deste gene em populações indígenas, oriental, africana e na população da região metropolitana de Curitiba. O polimorfismo de inserção-deleção de 14pb foi analisado em eletroforese com gel de poliacrilamida 8%, enquanto a genotipagem para os alelos foi feita através de sequenciamento. Não foi encontrada nenhuma associação das regiões analisadas de *HLA-G* com o pênfigo foliáceo. Foram identificados cinco alelos nas populações estudadas, todos os quais apareceram nos africanos, nos quais se espera haver uma maior diversidade alélica. Já as populações indígenas apresentaram menor diversidade alélica, em conformidade com os sucessivos efeitos de fundador e deriva genética ocorridos ao longo da história de povoamento da América. Essas populações também têm maiores frequências da inserção de 14pb. A inserção de 14pb está em forte desequilíbrio de ligação com o alelo *G\*01:03* em todas as populações analisadas. O haplótipo *Ins-G\*01:03* é o mais frequente nas populações Kaingang, enquanto que *Del-G\*01:01* e *Ins-G\*01:01* são os que apresentam maior frequência em Guarani. Já em africanos e em orientais, os haplótipos *Del-G\*01:01* e *Del-G\*01:04* são os mais comuns. O sequenciamento do DNA de alguns indivíduos na outra direção será necessário para reconfirmar os alelos, assim como para resolver algumas ambiguidades alélicas e genotípicas.

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – MAPA GENÉTICO DO MHC.....	13
FIGURA 2 – ESTRUTURA DE MOLÉCULAS MHC DE CLASSE I.....	15
FIGURA 3 – ESTRUTURA DE MOLÉCULAS MHC DE CLASSE II.....	16
FIGURA 4 – MODELO ESQUEMÁTICO DO GENE <i>HLA-G</i> MOSTRANDO OS ÉXONS E OS DOMÍNIOS DA PROTEÍNA CODIFICADOS POR CADA ÉXON.....	18
FIGURA 5 – MODELO ESQUEMÁTICO DO RNAm PRIMÁRIO DE <i>HLA-G</i> E SEUS TRANSCRITOS.....	19
FIGURA 6 – RECEPTORES DE HLA-G.....	20
FIGURA 7 – MAPA DA AMÉRICA DO SUL MOSTRANDO EM DESTAQUE AS ÁREAS DE RESERVA ONDE VIVEM AS POPULAÇÕES INDÍGENAS ANALISADAS.....	26
FIGURA 8 – MAPA DO CONTINENTE AFRICANO MOSTRANDO OS PAÍSES DE ORIGEM DOS AFRICANOS ANALISADOS.....	27
FIGURA 9 – RISCO RELATIVO DOS ALELOS E GENÓTIPOS DO <i>INDEL</i> DE 14BP COM PF.....	37
FIGURA 10 – DENDROGRAMA BASEADO NAS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS FORMADOS PELOS ALELOS <i>HLA-G</i> E O <i>INDEL</i> DE 14BP.....	45

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS NOS CONTROLES A PARTIR DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>HLA-G</i> .....	33
TABELA 2 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS NOS PACIENTES DE PF A PARTIR DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>HLA-G</i> ....	34
TABELA 3 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E DE PORTADORES DE ALELOS EM EUROBRASILEIROS EM PF E CONTROLES E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO.....	34
TABELA 4 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E DE PORTADORES DE ALELOS EM AFROBRASILEIROS EM PF E CONTROLES E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO.....	35
TABELA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS EM PACIENTES DE PF A PARTIR DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO <i>INDEL</i> DE 14BP DE <i>HLA-G</i> .....	35
TABELA 6 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS NOS CONTROLES A PARTIR DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO <i>INDEL</i> DE 14BP DE <i>HLA-G</i> .....	36
TABELA 7 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO <i>INDEL</i> DE 14PB EM PF E CONTROLES NO TOTAL DE AMOSTRAS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO....	36
TABELA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS EM CONTROLES A PARTIR DE FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS FORMADAS PELO <i>INDEL</i> DE 14BP E ALELOS DE <i>HLA-G</i> .....	37
TABELA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS EM PACIENTES DE PÊNFIGO A PARTIR DE FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS FORMADAS PELO <i>INDEL</i> DE 14BP E ALELOS DE <i>HLA-G</i> .....	38
TABELA 10 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS ENTRE PF E CONTROLES EM EUROBRASILEIROS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO.....	38
TABELA 11 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS ENTRE PF E CONTROLES EM AFROBRASILEIROS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO.....	39
TABELA 12 – INFERÊNCIA DE ALELOS <i>HLA-G</i> A PARTIR DE HAPLÓTIPOS <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> E <i>-C</i> .....	40
TABELA 13 – DESCRIÇÃO DOS ALELOS DE <i>HLA-G</i> NAS POPULAÇÕES ANALISADAS.....	41
TABELA 14 – CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES EM RELAÇÃO AO <i>INDEL</i> DE 14PB.....	42

TABELA 15 – HAPLÓTIPOS ENTRE O <i>INDEL</i> DE 14PB E OS ALELOS DE <i>HLA-G</i> .....	43
---	----

TABELA 16 – DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL DE ACORDO COM OS HAPLÓTIPOS ANALISADOS.....	44
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFR	- Africanos
AFROBR	- Afrobrasileiros
EUROBR	- Eurobrasileiros
GKW	- Guarani Kaiowá
GND	- Guarani Nandeva
GRC	- Guarani M'byá
HLA	- human leukocyte antigen
Indel	- Inserção-deleção
KIV	- Kaingang de Ivaí
KRC	- Kaingang de Rio das Cobras
LGMH	- Laboratório de Genética Molecular Humana
MHC	- major histocompatibility complex
NK	- natural killer
ORIBR	- Orientais brasileiros
PF	- pênfigo foliáceo
SNP	- single nucleotide polymorphism

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
2.1 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.....	13
2.1.1 Mapa genético do MHC.....	13
2.1.2 Moléculas do MHC.....	14
2.1.3 Genes do MHC humano.....	16
2.2 HLA-G.....	17
2.2.1 Polimorfismo de inserção-deleção de 14pb.....	20
2.2.2 Outros polimorfismos.....	21
2.3 PÊNFIGO FOLIÁCEO.....	22
<b>3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....</b>	<b>24</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	25
4.2 GENOTIPAGEM E SEQUENCIAMENTO.....	28
4.3 ANÁLISES.....	31
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
5.1 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO COM PF.....	33
5.1.1 Alelos de <i>HLA-G</i> .....	33
5.1.2 Polimorfismo <i>indel</i> de 14pb de <i>HLA-G</i> .....	35
5.1.3 Haplótipos entre o polimorfismo <i>indel</i> de 14pb e os alelos de <i>HLA-G</i> .....	37
5.2 ESTUDO DE POPULAÇÕES.....	39
5.2.1 Alelos de <i>HLA-G</i> .....	39
5.2.2 Polimorfismo de inserção-deleção de 14pb.....	41
5.2.3 Haplótipos entre o polimorfismo <i>indel</i> de 14pb e os alelos de <i>HLA-G</i> .....	42
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>

6.1 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO COM PF.....	46
6.2 ESTUDO POPULACIONAL.....	46
6.3 CONSIDERAÇÕES.....	49
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A expressão da molécula HLA-G foi inicialmente descrita na interface materno-fetal no citotrofoblasto, tendo sido então proposto que ela contribui para a proteção do feto, que constitui um tecido semiallogênico passível de ser reconhecido pelo sistema imune da mãe. Outros estudos mostraram que a expressão dessa molécula não estava restrita ao tecido fetal, e também mostraram que suas funções iam além do contexto da gravidez.

Além de sua expressão restrita em tecidos saudáveis, a expressão de HLA-G pode ser induzida em inúmeras condições patológicas onde sua função tolerogênica pode ser tanto favorável como em detrimento do paciente.

A caracterização de populações para genes que codificam moléculas importantes para as respostas imunes pode servir como referência para estudos de associação a doenças, pois estes genes podem ter um papel importante na patogênese e seus polimorfismos podem estar associados à maior ou menor susceptibilidade ao desenvolvimento destas doenças.

A identificação de genes cujas frequências alélicas diferem entre populações permite que os alelos sejam usados como marcadores de ancestralidade. Assim, o estudo do maior número possível de genes pode ser extremamente útil na reconstrução da história evolutiva das populações humanas.

Neste estudo, verificou-se a existência ou não de associação de genótipos e alelos do gene *HLA-G* com a doença autoimune pênfigo foliáceo. Além disso, a diversidade alélica de *HLA-G* foi caracterizada em populações indígenas, oriental, africana e na população da região metropolitana de Curitiba.



### 2.1.2 Moléculas do MHC

As moléculas do MHC são responsáveis pela apresentação de fragmentos de antígenos às células do sistema imune. Sua principal característica estrutural é um longo sulco formado ao longo da superfície, no qual uma grande variedade de peptídeos derivados de patógenos pode ser ligada. As moléculas do MHC são altamente polimórficas, sendo que cada tipo de molécula do MHC ocorre em muitas versões diferentes dentro da população. A maioria das pessoas é heterozigota para as moléculas do MHC, o que aumenta a gama de peptídeos que podem se ligar (CALICH e VAZ, 2009; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Os genes *MHC* estão presentes em todas as espécies de vertebrados e são homólogos aos genes *H-2* que foram inicialmente identificados em camundongos. Há duas classes de moléculas do MHC – MHC classe I, que apresentam peptídeos para as células T CD8+, e MHC classe II, apresentadoras de peptídeos reconhecidas pelas células T CD4+ (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

As moléculas do MHC classe I consistem em duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não-covalente; uma cadeia  $\alpha$  codificada pelo MHC (ou cadeia pesada) de 44 a 47 kD e uma subunidade de 12 kD, que não é codificada pelo MHC, chamada de  $\beta_2$ -microglobulina. A cadeia  $\alpha$  possui cinco regiões ou domínios, dos quais três são extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ ), um transpassa a membrana celular e outro penetra no citoplasma. Os segmentos aminotermiais (N-terminal)  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , cada qual contendo aproximadamente 90 aminoácidos, interagem para formar uma plataforma de oito lâminas  $\beta$  pregueadas nas quais se apóiam duas  $\alpha$ -hélices paralelas. O seu tamanho é suficiente ( $\sim 25\text{\AA} \times 10\text{\AA} \times 11\text{\AA}$ ) para ligar peptídeos contendo de oito a onze aminoácidos em uma conformação flexível e prolongada. As extremidades da fenda de ligação de peptídeos das moléculas classe I são fechadas, impedindo a ligação de peptídeos maiores. Os resíduos polimórficos das moléculas classe I estão confinados aos domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , onde contribuem para as variações na ligação de peptídeos e no reconhecimento pelas células T dos diversos alelos classe I. O segmento  $\alpha 3$  da cadeia se dobra para formar um domínio de Ig, cuja sequência de aminoácidos é a mesma em todas as moléculas classe I. No terminal carboxila do segmento  $\alpha 3$  existe uma extensão de aproximadamente 25 aminoácidos hidrofóbicos que atravessam a bicamada lipídica da membrana plasmática. Ao seu lado encontra-se cerca de 30 aminoácidos, que estão localizados no citoplasma, nos quais está incluído um agrupamento de aminoácidos básicos que interage com a extremidade de fosfolipídeos da parte interna da camada lipídica dupla e ancora a molécula do MHC na membrana plasmática (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; SILVA e MOTA, 2003) (FIGURA 2).

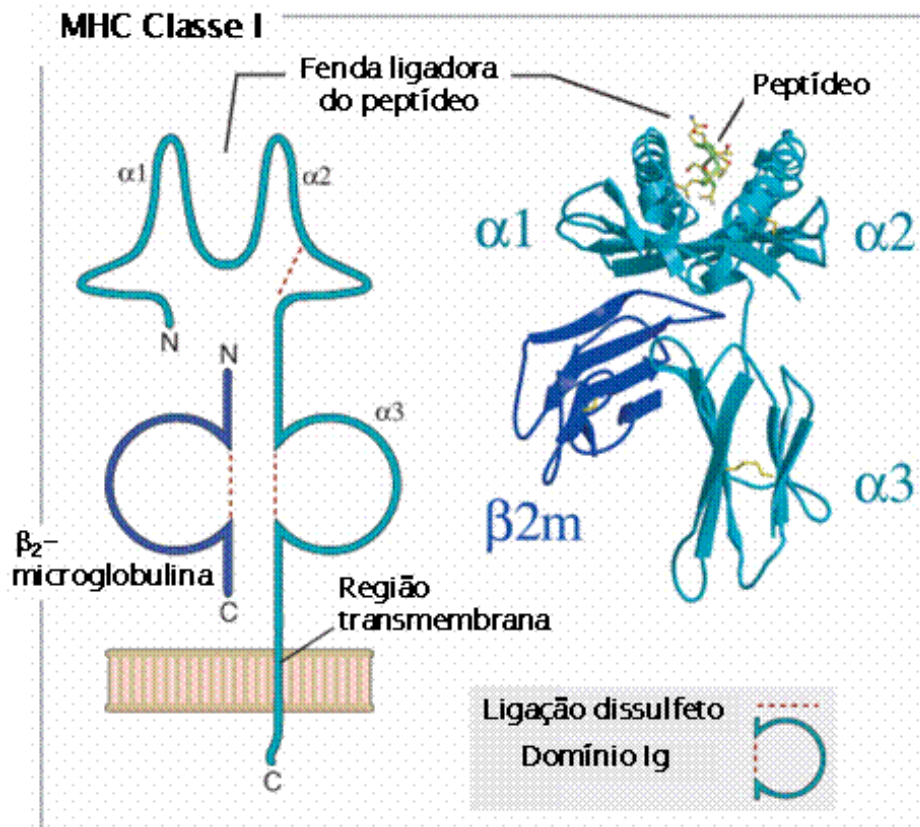


FIGURA 2 – Estrutura de moléculas MHC de classe I (ABBAS *et al.*, 2008).

As moléculas do MHC classe II são compostas de duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não-covalente, uma cadeia  $\alpha$  com 32 a 34 kD, e uma cadeia  $\beta$  de 29 a 32 kD. Ao contrário das moléculas do MHC classe I, ambas as cadeias das moléculas classe II são codificadas por genes do MHC polimórficos. Os segmentos aminoterminais  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  das cadeias classe II interagem para formar a fenda de ligação de antígenos, que é estruturalmente semelhante à fenda das moléculas classe I (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008). Cada cadeia apresenta dois domínios denominados  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  e  $\beta 2$ . Os domínios  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  são polimórficos e ligam, de maneira não covalente, peptídeos de 15 a 24 aminoácidos ou até mais. Os domínios  $\alpha 2$  e  $\beta 2$  são constantes e se ligam à membrana celular. Como o sítio de ligação das moléculas de classe II possuem extremidades abertas, os peptídeos apresentados podem ser maiores que aqueles que se ligam às moléculas de classe I (CALICH e VAZ, 2009) (FIGURA 2).

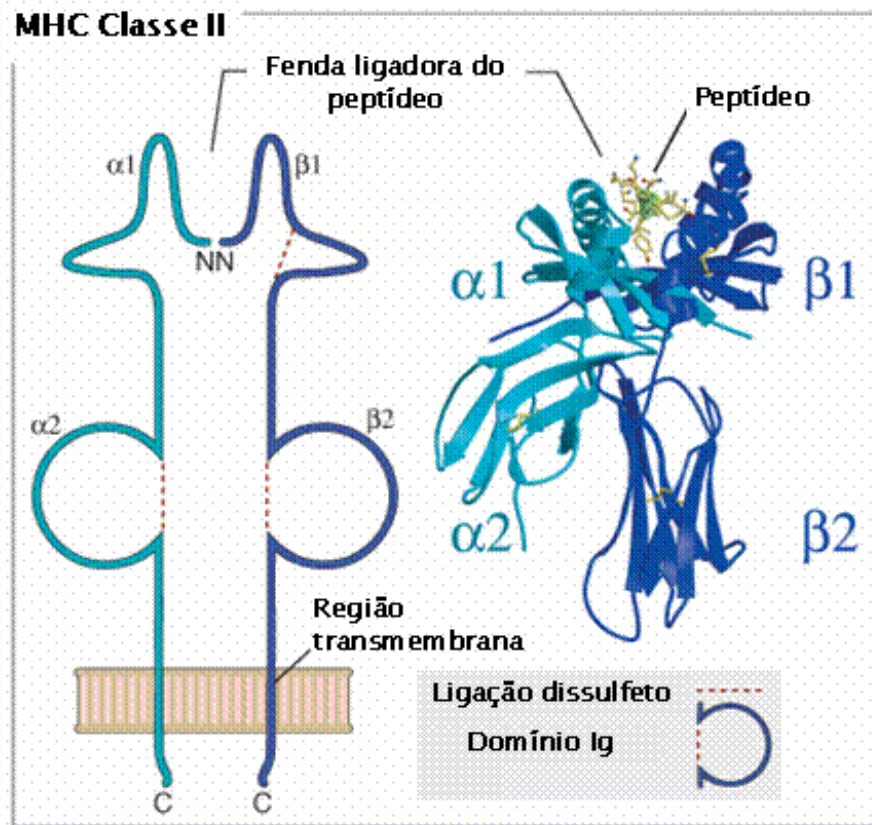


FIGURA 3 – Estrutura de moléculas MHC de classe II (ABBAS *et al.*, 2008).

### 2.1.3 Genes do MHC humano

No homem, o MHC contém mais de 200 genes, entre eles estão os chamados *Human Leukocyte Antigen (HLA)*, pela sua descoberta ter ocorrido primeiramente por meio de diferenças entre leucócitos de diferentes indivíduos, e estudos foram realizados para construir um mapa do *locus* HLA. Atualmente, sabe-se que as diferenças nos alelos *HLA* entre as pessoas são importantes na determinação da rejeição de transplantes (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Há aproximadamente 20 genes MHC de classe I, que estão na região mais telomérica do locus do HLA. Três deles são *HLA-A*, *-B* e *-C*, chamados genes clássicos ou de classe Ia. Existem também os genes de classe I não-clássicos ou de classe Ib, são eles *HLA-E*, *-F* e *-G*. Há ainda os genes do MHC de classe II, chamados de *HLA-DR*, *-DP* e *-DQ*, que ocupam a região mais centromérica do locus do HLA (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008; MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010; KLEIN e SATO, 2000). Os genes MHC de classe III não são genes *HLA*, eles codificam para várias proteínas com



funções diferentes no sistema imune, incluindo componentes do sistema de complemento e moléculas envolvidas na inflamação (<imunologia.ufp.pt/Imuno\_MED/.../Teorica05.ppt>).

## 2.2 HLA-G

*HLA-G* situa-se próximo de *HLA-A*, e há evidências de que alelos destes dois genes têm um notável desequilíbrio de ligação. Esse nível de desequilíbrio é similar ao observado na região de classe II, entre o loci *HLA-DR* e *HLA-DQ*, onde eventos de recombinação nunca foram diretamente observados. Por analogia, o desequilíbrio de ligação observado entre os loci *HLA-A* e *HLA-G* sugere que a recombinação entre esses dois loci também é rara (OBER *et al.*, 1996).

A molécula HLA-G difere das moléculas HLA classe I clássicas pela limitada variabilidade proteica; pela presença de isoformas solúveis e ligadas à membrana, geradas por *splicing* alternativo do transcrito primário; pela estrutura molecular única, apresentando uma cauda citoplasmática reduzida; pela função de modulação da resposta imune; e pela expressão tecidual restrita. Sítios polimórficos presentes nas regiões codificadoras e não-codificadoras do gene *HLA-G* podem afetar potencialmente todas estas características (DONADI *et al.*, 2011).

Semelhante às moléculas HLA classe I clássicas, HLA-G apresenta uma cadeia pesada, não covalentemente associada com a  $\beta_2$ -microglobulina. O gene *HLA-G* também apresenta similaridade ao loci HLA clássico, exibindo 7 íntrons e 8 éxons, codificando somente a cadeia pesada da molécula e localizada no cromossomo 6, enquanto a  $\beta_2$ -microglobulina é codificada por um gene no cromossomo 15. O éxon 1 de *HLA-G* codifica o peptídeo-sinal; os éxons 2, 3 e 4, os domínios extracelulares  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ , respectivamente; o éxon 5, o domínio transmembrana; e o éxon 6 codifica o domínio citoplasmático da cadeia pesada (DONADI *et al.*, 2011) (FIGURA 4).

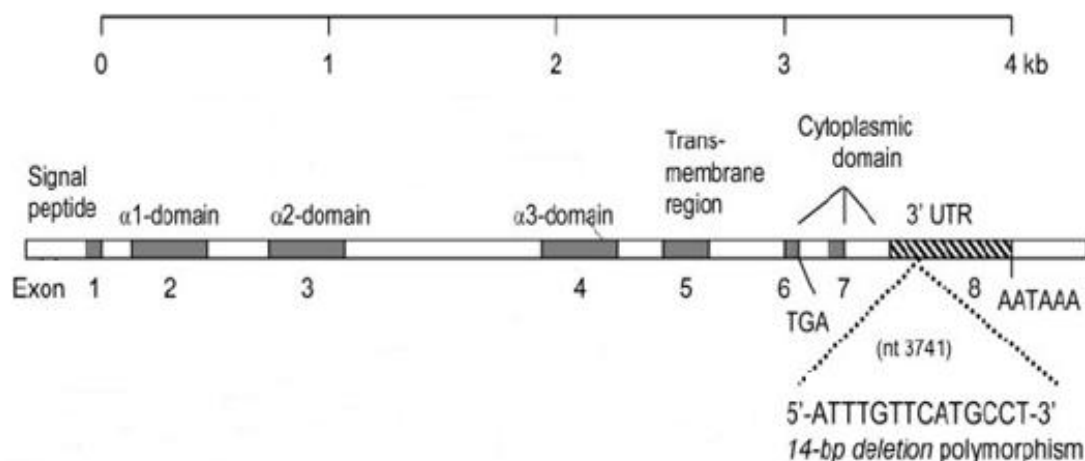


FIGURA 4 – Modelo esquemático do gene *HLA-G* mostrando os éxons e os domínios da proteína codificados por cada éxon. (Adaptado de HVIID, 2006).

Sete diferentes RNAm de HLA-G foram identificados, que codificam quatro isoformas ligadas à membrana (G1, G2, G3 e G4) e três isoformas solúveis (G5, G6 e G7) (ISHITANI e GERAGHTY, 1992; PAUL *et al.*, 2000). HLA-G1 é a isoforma completa, isto é, possui os domínios extracelulares  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ , a região transmembrana e a região citoplasmática da cadeia pesada. As outras isoformas de HLA-G sofrem *splicing* alternativo, cujos transcritos não possuem regiões complementares a um ou mais éxons. HLA-G2 não possui o éxon 3, correspondente ao domínio  $\alpha 2$ ; HLA-G3 não possui os éxons 3 e 4, por isso só apresenta o domínio  $\alpha 1$ ; e HLA-G4 não possui o éxon 4, portanto não possui o domínio  $\alpha 3$ . HLA-G5 e HLA-G6 são equivalentes a HLA-G1 e -G2, respectivamente, mas devido a um processo de *splicing* incompleto, eles retêm o íntron 4, que possui um códon de término. Isso faz com que a região transmembrana não seja transcrita nessas moléculas, resultando na expressão de proteínas solúveis. Por isso, também são conhecidas como HLA-G1 e HLA-G2 solúveis. Já a isoforma HLA-G7 contém o íntron 2, que também possui um códon de término, e por isso esta molécula possui somente o domínio  $\alpha 1$  (SARGENT, 2005) (FIGURA 5).

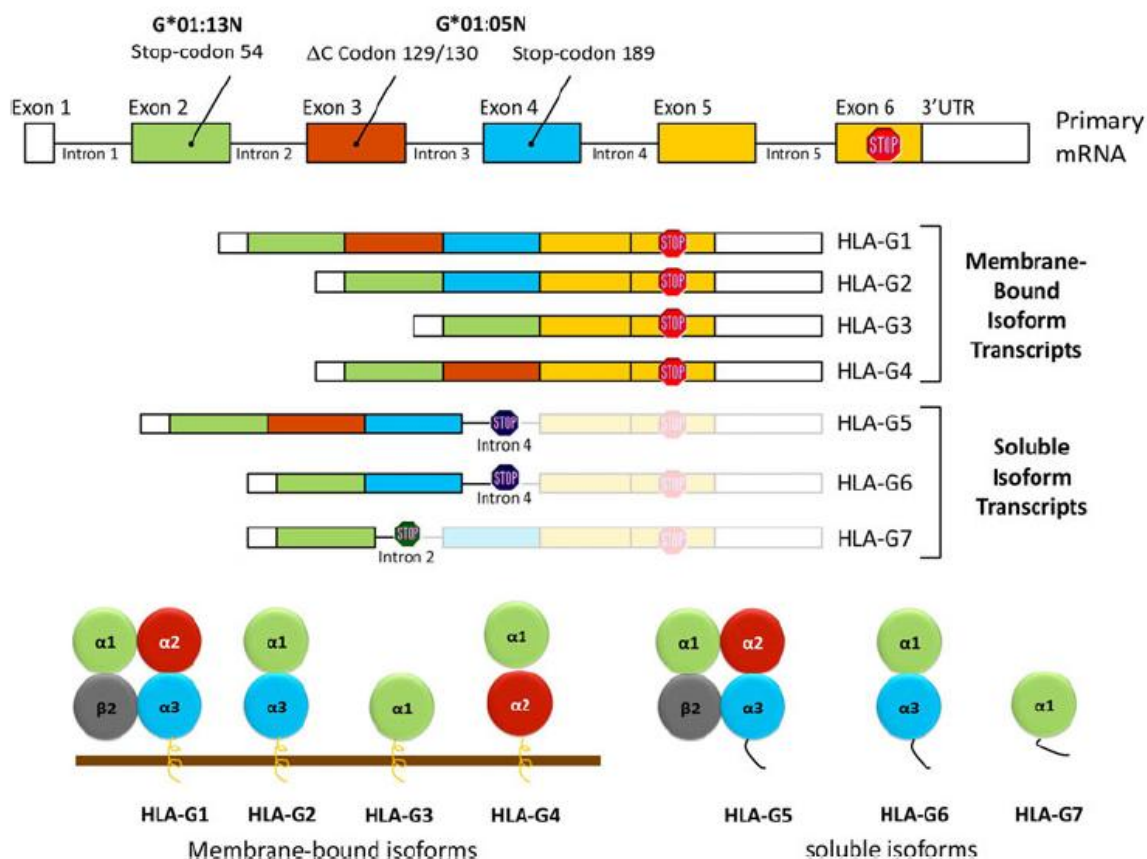


FIGURA 5 – Modelo esquemático do RNAm primário de *HLA-G* e seus transcritos (DONADI *et al.*, 2011).

HLA-G exerce um papel crítico não só no contexto da gravidez, mas também em outras condições que envolvem funções similares de inibições do sistema imune, como câncer, transplante, doenças autoimunes e patologias virais (CAROSELLA e LEMAOULT, 2011).

Em indivíduos saudáveis, um nível basal da transcrição de *HLA-G* é observado na maioria das células e tecidos. Entretanto, a tradução em proteínas HLA-G parece ser restrita ao trofoblasto, timo, córnea, matriz da unha, pâncreas e precursores eritróides e endoteliais. Moléculas HLA-G também podem ser encontradas após transplante de órgãos, em transformações malignas, infecções virais e doenças inflamatórias e autoimunes (CAROSELLA *et al.*, 2008).

HLA-G possui a capacidade comum às outras moléculas HLA de classe I de se ligar a receptores inibidores. Os três receptores já descritos que ligam essa molécula são ILT2, ILT4 e KIR2DL4 (FIGURA 6). ILT2 é expresso pelas células B, algumas células T, algumas células NK e em todos os monócitos e células dendríticas. ILT4 é específica a células mielóides e é somente expressa por monócitos e células dendríticas. Já a expressão de KIR2DL4 é principalmente restrita às células NK CD56<sup>bright</sup>, que constituem uma minoria de

células NK periféricas, mas uma maioria de células NK uterinas (COLONNA *et al.*, 1997; COLONNA *et al.*, 1998; RAJAGOPALAN e LONG, 1999). ILT2 e ILT4 são receptores inibidores, mas KIR2DL4 também pode se comportar enviando sinais ativadores. Outra diferença é que ILT2 e ILT4 também se ligam às moléculas HLA clássicas, enquanto KIR2DL4 só interage com HLA-G. ILT2 é um receptor para moléculas HLA-G associadas com  $\beta_2$ -microglobulina, enquanto ILT4 também reconhece HLA-G com cadeia pesada livre. Além desses receptores, HLA-G parece se ligar a CD8 (CAROSELLA *et al.*, 2008).

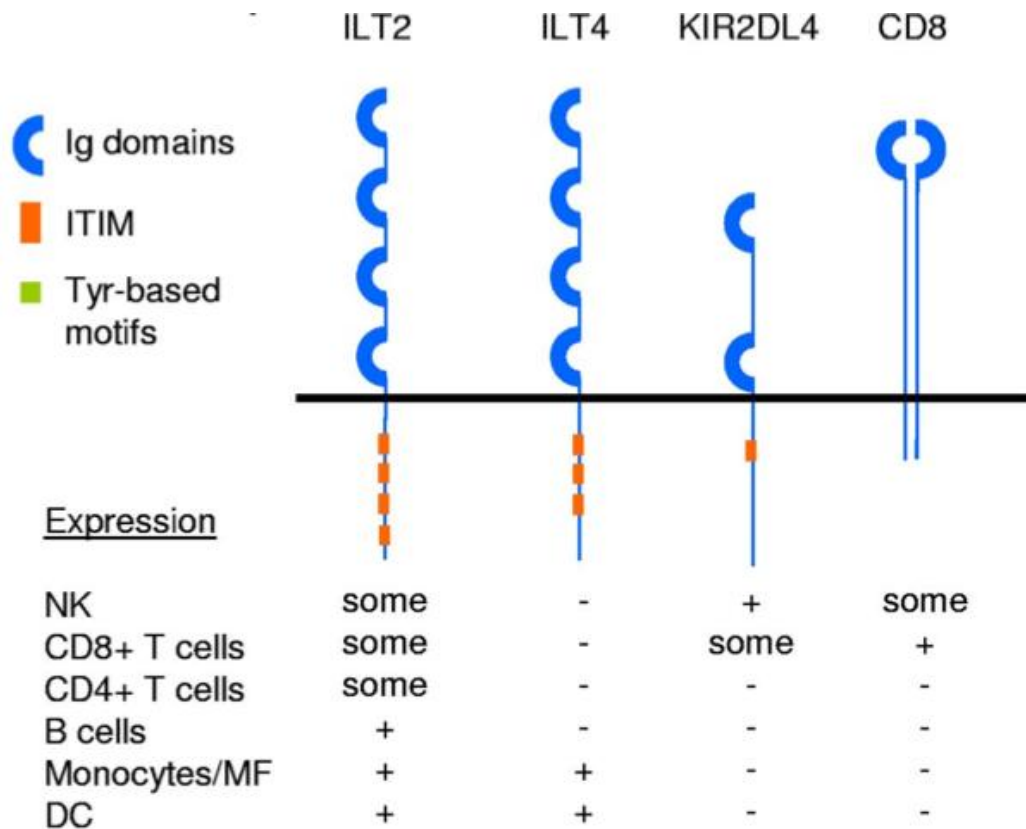


FIGURA 6 - Receptores de HLA-G (CAROSELLA *et al.*, 2008).

### 2.2.1 Polimorfismo de inserção-deleção de 14pb

Foi proposto que alelos e genótipos do polimorfismo *indel* de 14pb (rs16375), este presente no éxon 8 de *HLA-G*, seja um fator de risco para algumas doenças autoimunes. Pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática em uma população Han chinesa mostraram altas frequências do genótipo -14pb/-14pb e de alelos -14pb (LIN *et al.*, 2007). Para lupus eritematoso sistêmico, verificou-se que um grupo de pacientes de Porto Alegre com genótipos heterozigotos para o *indel* de 14pb exibiu menores índices de

atividade dessa doença que os homozigotos para esse polimorfismo (VEIT *et al.*, 2009). Esses resultados são contrastantes com outro estudo que mostrou que alelos +14pb e o genótipo +14pb/+14pb eram mais frequentes em pacientes italianos com lúpus (RIZZO *et al.*, 2008). Pacientes judeus com pênfigo vulgar mostraram altas frequências do alelo -14bp quando comparados com os controles (GAZIT *et al.*, 2004). Além disso, este polimorfismo tem sido associado a abortos recorrentes (HVIID *et al.*, 2002; HVIID *et al.*, 2004) e preeclampsia (HYLENIUS *et al.*, 2004).

Alelos de *HLA-G* com a sequência de 14pb têm sido associados com uma menor produção de RNAm para a maioria das isoformas de *HLA-G* em amostras de trofoblasto (HVIID *et al.*, 2003). Esses alelos também sofrem *splicing* alternativo que remove os primeiros 92bp do éxon 8, o que torna essas moléculas mais estáveis que as formas completas de RNAm (ROUSSEAU *et al.*, 2003).

### 2.2.2 Outros polimorfismos

Considerando a região entre o éxon 1 ao éxon 6, que codifica a porção externa e a região transmembrana da molécula de *HLA-G*, todos esses segmentos apresentam muitas variações nucleotídicas. A região que codifica a cadeia pesada exibe 33 SNPs; entretanto, somente 13 variações de aminoácidos são observadas, sendo 4 deles no domínio  $\alpha 1$ , 6 no domínio  $\alpha 2$  e 3 no domínio  $\alpha 3$ . Os éxons 1 e 5 apresentam ambos somente duas substituições sinônimas, já que o peptídeo sinal e a porção transmembrana da molécula são invariáveis. Apesar da variabilidade proteica limitada, as substituições de aminoácidos podem influenciar na função biológica de *HLA-G*, incluindo a ligação ao peptídeo, produção de isoformas e habilidade para modular células do sistema imune.

Na região promotora de *HLA-G*, foram identificados até o momento 29 SNPs. Eles podem ser importantes na regulação da expressão de *HLA-G* e podem agir de diferentes formas. Em alguns casos, o polimorfismo na região promotora pode estar em desequilíbrio de ligação com variantes na 3'UTR, e alguns deles podem influenciar no *splicing* alternativo e na estabilidade do RNAm.

A região 3'UTR de *HLA-G* possui muitos sítios polimórficos que podem influenciar potencialmente na transcrição, tradução ou em outros diferentes mecanismos. Entre eles, está o SNP na posição +3142, que pode ser alvo de certos miRNAs, degradando o RNAm de *HLA-G*; e o SNP na posição 3187, que está relacionado à estabilidade e degradação de RNAm (DONADI *et al.*, 2011).

## 2.3 PÊNFIGO FOLIÁCEO

O pênfigo é uma doença autoimune de causa desconhecida e cujas lesões são provocadas por autoanticorpos patogênicos que atacam a epiderme. Existem diferentes tipos de pênfigo, duas das principais formas são o pênfigo vulgar e pênfigo foliáceo. Na forma vulgar, os anticorpos reconhecem como antígeno a desmogleína 3.

No pênfigo foliáceo, ocorre a produção de anticorpos que reconhecem como antígeno a desmogleína 1 (AMAGAI, 1995), uma proteína transmembrânica, fundamental para a formação dos desmossomas. Os desmossomas são as principais estruturas de adesão intercelular da epiderme e sua não funcionalidade causa o desprendimento superficial da pele na forma de bolhas, fenômeno denominado acantólise. Devido a sua grande fragilidade as bolhas se rompem rapidamente dando lugar a superfícies erosivas, escamosas ou a crostas hemorrágicas.

Sem tratamento adequado, grandes extensões da epiderme podem ser comprometidas. O tratamento do PF é inespecífico e faz-se principalmente com corticóides cujos efeitos secundários podem complicar a doença.

O PF é desencadeado pela combinação de fator(es) ambiental(ais) e de um componente genético resultante de vários genes. Os fatores ambientais são desconhecidos e se sabe muito pouco sobre os mecanismos genéticos e moleculares implicados na sua patogênese.

No Brasil, o PF ocorre nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e, principalmente, Mato Grosso do Sul; nos demais estados o número de casos relatados é pouco expressivo (CAMPBELL *et al.*, 2001). Acomete principalmente pessoas que vivem ou viveram em áreas rurais, principalmente nas proximidades de rios e córregos. Encontrou-se uma alta prevalência de casos de PF em algumas populações indígenas (HANS-FILHO *et al.*, 1999). Sua distribuição geográfica e a grande ocorrência de casos entre trabalhadores do campo e em populações indígenas, sugerem que o PF é desencadeado, em indivíduos susceptíveis, pela exposição a um ou mais fatores ambientais ainda desconhecidos. Suspeita-se que um inseto hematófago, mais especificamente um simuliídeo (família Simuliidae), possa atuar como agente desencadeador da resposta autoimune (LOMBARDI *et al.*, 1992).

Quanto ao componente genético, estudos de associação caso-controle demonstraram que alguns alelos HLA estão distribuídos de forma estatisticamente desproporcional entre os pacientes de PF e o grupo controle

(PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989; PAVONI *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 1991; MORAES *et al.*, 1997; CERNA *et al.*, 1993).

Uma das formas de procurar genes implicados na susceptibilidade ao PF é feita através de análises de associação caso-controle. Com este método, foi possível observar variações polimórficas que causam, em seus portadores, diferentes graus de predisposição ou proteção ao desenvolvimento desta doença. Como ocorre na maioria das doenças autoimunes, os genes do MHC estão entre os principais genes de susceptibilidade/resistência. Muitos dos polimorfismos conhecidos que influenciam a susceptibilidade à doença estão na região HLA de classe II e pertencem aos grupos ou linhagens alélicas *DR1* e *DR4*, principalmente. Na mesma região genômica, há também polimorfismos de classe II que diminuem a susceptibilidade à doença, sendo o mais bem definido o grupo alélico *HLA-DQ2* (PETZL-ERLER e SANTAMARIA, 1989).

Foi demonstrado que genes HLA têm uma forte influência sobre a susceptibilidade/resistência ao PF, mas estudos recentes propõem que genes localizados em outras partes do genoma, também participam da susceptibilidade/resistência ao PF (PEREIRA *et al.*, 2003; MALHEIROS e PETZL-ERLER, 2009; DALLA-COSTA *et al.*, 2010).

### 3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Considerando os vários estudos já publicados com indícios da existência de associação entre a variação polimórfica ou a variação de expressão do gene *HLA-G* com doenças autoimunes, como psoríase, artrite reumatóide, pênfigo vulgar, esclerose múltipla e cardiomiopatia dilatada idiopática, é de importância a análise de associações entre a variação genética de *HLA-G* e o pênfigo foliáceo. Não há ainda nenhum artigo publicado que tivesse verificado o possível envolvimento de *HLA-G* na patogênese dessa doença. Devido à importância da molécula *HLA-G* na resposta imune, estudos populacionais do gene *HLA-G* auxiliam a compreensão do possível impacto de sua variabilidade alélica nas diferentes populações. Além disso, o estudo da sequência nucleotídica dos genes é muito útil para o entendimento da origem e dinâmica dos seus polimorfismos, auxiliando para um melhor entendimento dos mecanismos evolutivos que atuam sobre este gene.

Este trabalho visou verificar a existência ou não de associação de genótipos e alelos do gene *HLA-G* com o pênfigo foliáceo, em um estudo caso-controle, assim como caracterizar a diversidade alélica do *HLA-G* em populações indígenas, oriental, africana e na população da região metropolitana de Curitiba. As frequências alélicas obtidas foram comparadas entre essas populações.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras para o estudo de associação com o pênfigo foliáceo foram coletadas de pacientes do Hospital Adventista do Pênfigo, na cidade de Campo Grande (MS) a partir de 1997 pela equipe do LGMH (Laboratório de Genética Molecular Humana). As amostras dos indivíduos controles também foram coletadas em Campo Grande. Os indivíduos foram classificados de acordo com características morfológicas faciais, para serem agrupados em certa etnia.

Para o estudo populacional, foram analisados indivíduos pertencentes a oito populações distintas. As frequências alélicas e genotípicas de *HLA-G* foram determinadas para uma amostra das populações africana, japonesa, urbana de Curitiba e região metropolitana e para cinco populações ameríndias pertencentes às tribos indígenas Guarani M'byá, da reserva indígena Rio das Cobras, município de Nova Laranjeiras, Paraná (PR); Guarani Kaiowá, dos municípios de Limão Verde e Amambaí, Mato Grosso do Sul (MS); Guarani Nandeva, dos municípios de Amambaí e Porto Lindo, MS; e Kaingang, das aldeias indígenas Rio das Cobras e Ivaí, município de Manoel das Ribas, PR (FIGURA 7).



FIGURA 7 – Mapa da América do Sul, mostrando em destaque a localização das áreas de reserva onde vivem as populações indígenas analisadas (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Nota: 1 - área de reserva Ivaí, município de Nova Laranjeiras, PR; 2 - área de reserva Rio das Cobras, município de Manoel Ribas, PR; 3 - áreas Amambaí e Limão Verde, município de Amambaí, MS; 4 - área de reserva indígena Porto Lindo, MS.

A amostra da população oriental é composta de descendentes de japoneses vindos para o Brasil nos últimos 103 anos. A amostra populacional africana é formada por indivíduos nascidos em quatro países da África (FIGURA 8), em sua maioria estudantes que vieram concluir seus estudos na cidade de Curitiba. A amostra da população brasileira é representada pela população residente em Curitiba e região metropolitana (dividida em EUROBR e AFROBR), cujas amostras foram coletadas a partir de 1994 pela equipe do LGMH.

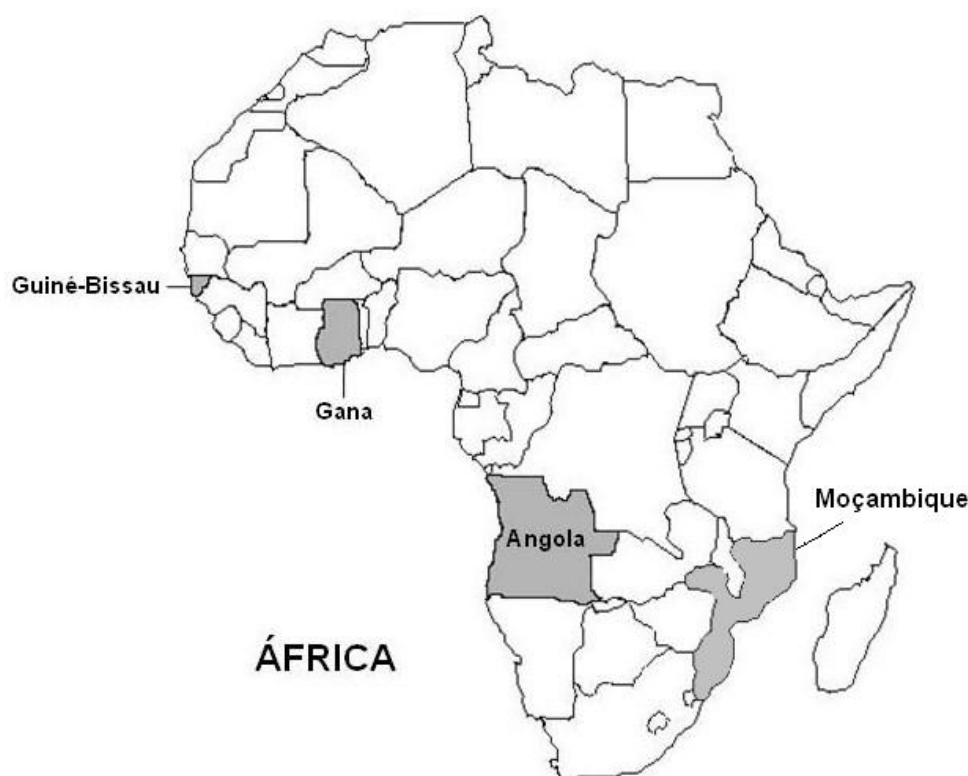


FIGURA 8 – Mapa do continente africano, mostrando em destaque os países de origem dos africanos analisados: Guiné-Bissau, Gana, Angola e Moçambique. (Adaptado de <<http://clio.rediris.es/actividades/africa/africa.htm>>).

Os indivíduos foram voluntários e assinaram um termo de consentimento para participação em pesquisa. A coleta de sangue dos indígenas foi autorizada pela Fundação Nacional do Índio (FUNAI), Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e pelos líderes das tribos. As amostras foram coletadas a partir da década de 1980 pela equipe do LGMH.

Para a análise dos alelos e dos haplótipos, foram considerados 136 pacientes de PF, com 61% de caucasóides, 24,3% de mulatos claros, 11,8% de mulatos médios, 2,2% de mulatos escuros e 0,7% de negros. Os controles consistiram no total de 90 amostras, com 63,3% de caucasóides, 22,2% de mulatos claros, 11,1% de mulatos médios, 2,2% de mulatos escuros e 1,1% de negros. Para o estudo de populações, as amostras de indígenas foram selecionadas a partir de haplótipos formados com *HLA-A*, *-C*, *-B*, *-DR* e *-DQ* relatados anteriormente para GRC, KRC e KIV (PARHAM *et al.*, 1997) e sequenciadas: GRC (n=15), GKW (n=4), GND (n=2), KRC (n=12) e KIV (n=10). Foi feita então uma inferência de genótipos de todos esses indígenas, a partir do trabalho de PARHAM *et al.* (1997) para verificar se era possível inferir alelos *HLA-G* através desses haplótipos. Como foi possível correlacionar alelos *HLA-G* com haplótipos constituídos de *HLA-A*, *-B* e *-C*, inferiu-se os genótipos de *HLA-G* para todas as amostras de indígenas analisadas neste estudo. Assim,

para o estudo populacional, foram considerados: AFR (n=17), ORIBR (n=52), GRC (n=73), KRC (n=58) e KIV (n=96).

Para a análise do polimorfismo *indel* de 14pb, foram considerados 204 pacientes de PF, com 61,8% de caucasóides, 20,1% de mulatos claros, 12,7% de mulatos médios, 3,9% de mulatos escuros e 1,5% de negros. Para os controles, foram utilizadas 147 amostras, com 61,9% de caucasóides, 21,8% de mulatos claros, 12,2% de mulatos médios, 2,7% de mulatos escuros e 1,4% de negros. No estudo populacional, foram considerados: AFR (n=38), AFROBR (n=25), ORIBR (n=125), EUROBR (n=174), KIV (n=131), KRC (n=110), GND (n=84), GRC (n=95) e GKW (n=156).

## 4.2 GENOTIPAGEM E SEQUENCIAMENTO

O DNA foi extraído a partir do sangue total, através dos métodos fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK *et al.*, 1989, com protocolo adaptado do 13º IHWC, 2000) e salting-out (LAHIRI e NURNBERGER, 1991).

Os primers utilizados para amplificar o *indel* de 14pb foram 5'-GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC-3' e 5'-GGAAGGAATGCAGTTCAGCA-TGA-3'. A amplificação foi feita com as seguintes condições: volume final de 20µl contendo tampão sulfato 1x, 0,2mM de dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2µM de cada primer, 0,02U/µl de *Taq* polymerase e 2µg/ml de DNA. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e uma etapa final de alongamento a 72°C por 10 minutos.

Para a genotipagem deste polimorfismo *indel* de 14pb, os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, com os tamanhos dos amplicons de 224pb e/ou 210pb. Para um volume final de aproximadamente 25ml de gel de poliacrilamida nesta concentração, utilizou-se 6,67ml de uma solução de acrilamida:bisacrilamida (29:1), 1,25ml de glicerol 5%, 17,08ml de tampão TBE 0,5% (Tris, ácido bórico e EDTA), 250µl de persulfato de amônio 1% e 25µl de TEMED (C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>). Estes dois últimos reagentes foram colocados rapidamente, pois são os responsáveis pela polimerização do gel. Cada eletroforese durou 3 horas, em uma voltagem de 270V.

A coloração dos géis de poliacrilamida foi feita com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), da seguinte forma:

- Lavagem com solução de  $\text{HNO}_3$  1% por 3 minutos;
- Lavagem com água destilada (2 vezes);
- Lavagem com  $\text{AgNO}_3$  0,2% por 20 minutos;
- Lavagem com água destilada (2 vezes);
- Adição de um terço da solução reveladora, composta de 170ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e 92 $\mu\text{l}$  de formaldeído; retirar o gel quando a solução ficar escura;
- Adição dos dois terços restantes da solução reveladora;
- Lavagem com água destilada (2 vezes);
- Lavagem com ácido acético 10% por 5 minutos;
- Lavagem com água destilada (2 vezes);
- Adição de gotas de metanol:glicerol (30:1), espalhando sobre o gel; esperar 10 minutos para guardar o gel.

Para amplificar o éxon 2, foram utilizados os primers 5'–GGGTCTCGGC–GGGTCTCAA–3' e 5'–TCCGTGGGGCATGGAGGT–3'. A amplificação foi realizada com as seguintes condições: volume final de 12 $\mu\text{l}$  contendo tampão sulfato 1x, 0,2mM de dNTP, 2,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 $\mu\text{M}$  de cada primer, 5% de DMSO (dimetilsulfóxido), 0,02U/ $\mu\text{l}$  de *Taq* polimerase e 2 $\mu\text{g/ml}$  de DNA. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 15 segundos, anelamento a 65,3°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; e uma etapa final de alongamento a 72°C por 5 minutos.

Para a amplificação do éxon 3, foram utilizados os primers 5'–CCAGAC–CCTCTACCTGGGAGA–3' e 5'–CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG–3'. A PCR foi realizada com as seguintes condições: volume final de 12 $\mu\text{l}$  contendo tampão sulfato 1x, 0,2mM de dNTP, 1,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 $\mu\text{M}$  de cada primer, 0,02U/ $\mu\text{l}$  de *Taq* polimerase e 2 $\mu\text{g/ml}$  de DNA. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 67,1°C por 1 minuto e extensão a 72°C a 1 minuto; e uma etapa final de alongamento a 72°C por 10 minutos.

Para amplificar o éxon 4, foram utilizados os primers 5'–CCATGAGAG–ATGCAAAGTGCT–3' e 5'–TGCTTTCCCTAACAGACATGAT–3'. A amplificação foi realizada com as seguintes condições: volume final de 12 $\mu\text{l}$  contendo tampão sulfato 1x, 0,2mM de dNTP, 1,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 $\mu\text{M}$  de cada primer, 0,02U/ $\mu\text{l}$  de *Taq* polimerase e 2 $\mu\text{g/ml}$  de DNA. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53,5°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; e uma etapa final de alongamento a 72°C por 7 minutos.

Verificou-se a amplificação dos produtos de PCR dos éxons 2, 3 e 4 em gel de agarose 1%. Para todos estes éxons, a eletroforese foi realizada com

uma voltagem de 95V, em cerca de 30 minutos, utilizando como corante GelRed (Biotium®) 2x em DMSO diluído em solução azul de bromofenol e visualizado sob luz UV. Os tamanhos dos fragmentos amplificados para os éxons 2, 3 e 4 foram 362bp, 456bp e 364bp, respectivamente.

A quantificação dos produtos de PCR foi feita através da utilização de 2µl do marcador de quantificação (*Low DNA Mass Ladder*, Invitrogen®), também aplicado no gel de agarose 1% juntamente com o GelRed (Biotium®) 2x em solução azul de bromofenol. As bandas dos amplicons foram quantificadas por comparação com as bandas do marcador, e foram escolhidos para sequenciamento aqueles que tinham uma concentração de DNA de aproximadamente 200ng. Os primers para sequenciamento foram os mesmos utilizados para amplificação, sendo que cada éxon só foi sequenciado em uma direção. Assim, para o éxon 2, foi utilizado o primer *forward* 5'-GGGTCGGGC-GGGTCTCAA-3'; para o éxon 3, o primer *reverse* 5'-CTCTCCTTGCTAGGCCAGGCTG-3'; e para o éxon 4, o primer *forward* 5'-CCATGAGAG-ATGCAAAGTGCT-3'.

Os produtos de PCR foram purificados para eliminar os reagentes em excesso e tornar viável a reação de sequenciamento. Para esse fim, foram utilizadas 4U da enzima Exonuclease I (Fermentas®) e 0,7U da enzima Shrimp Alkaline Phosphatase (Fermentas®), em um volume final de 2µl. As condições de ciclagem foram: ativação enzimática a 37°C por 60 minutos e inativação enzimática a 80°C por 15 minutos.

Para as reações de sequenciamento, utilizou-se 1µl de Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1 (Applied Biosystems), 0,5µl de primer 10pmol, 3µl de Big Dye® Terminator v. 1.1, v. 3.1 1x Sequencing Buffer e 3µl de DNA, em um volume final de 10µl. Essas reações foram realizadas em MicroAmp® Optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems). As condições de ciclagem consistiram em uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto; seguida por 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto e 30 segundos.

Após a reação de sequenciamento, uma nova purificação foi realizada antes da injeção das amostras no sequenciador. Para a precipitação do DNA foi adicionado 2,5µl de EDTA 125mM e 30µl de etanol absoluto. Após incubação em temperatura ambiente por 15 minutos, seguiu-se uma centrifugação a 3220 G por 45 minutos a 15°C. A placa é então virada bruscamente para descartar o sobrenadante e centrifugada invertida rapidamente até 300 G. São adicionados 30 µl de etanol 70% à temperatura ambiente e é feita uma centrifugação a 2500 G por 5 minutos a 25°C. O sobrenadante é novamente descartado virando bruscamente e a placa é centrifugada invertida até 300 G. Antes de armazenar a -20°C com 96-Well

Plate Septa (Applied Biosystems), a placa foi deixada aberta, coberta com papel alumínio, à temperatura ambiente por 10 minutos, para que todo o álcool evaporasse. As amostras foram ressuspensas em 10µl de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) somente antes das corridas de sequenciamento.

As corridas de sequenciamento foram realizadas no sequenciador 3500xL Genetic Analyzers (Applied Biosystems), que utilizou os seguintes reagentes: POP-7™ Polymer for 3500/3500xL Genetic Analyzers, Anode Buffer Container (ABC) 3500 Series, Cathode Buffer Container (CBC) 3500 Series e Conditioning Reagent 3500 Series (Applied Biosystems). A visualização dos cromatogramas, a análise da qualidade das sequências e o alinhamento foram realizados através dos programas Chromas Lite versão 2.01 (Technelysium) e Mutation Surveyor® DNA Variant Analysis Software versão 3.30 (Softgenetics).

#### 4.3 ANÁLISES

A identificação da fase gamética dos sítios heterozigotos encontrados e a determinação dos alelos presentes em cada indivíduo foram realizadas com o auxílio do programa *online dbMHC* disponível no NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>).

As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *indel* de 14pb foram obtidas por contagem direta.

As frequências haplotípicas para as combinações entre os alelos inferidos com base nas sequências dos éxons 2, 3 e 4 e o *indel* de 14pb foram estimadas pelo algoritmo EM com auxílio do pacote de programas ARLEQUIN versão 3.11.

Essas frequências haplotípicas foram comparadas entre pacientes e controles através do teste exato de Fisher em tabelas de contingência 2x2, utilizando um programa *online* RxC (<<http://faculty.vassar.edu/lowry/odds2x2.html>>).

O teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado através do teste exato de Fisher, implementado pelo algoritmo metropolis, disponível no ARLEQUIN versão 3.11.

A diferenciação populacional foi estimada através do cálculo de  $F_{ST}$ , com o auxílio do programa ARLEQUIN versão 3.11. Os valores de  $F_{ST}$  refletem as distâncias genéticas entre as populações e foram então utilizadas para construção do dendrograma, utilizando o método Neighbor-Joining, com o auxílio dos programas PHYLIP versão 3.69 e TREEVIEW. O teste de

neutralidade seletiva de Ewens-Watterson foi realizado no programa ARLEQUIN versão 3.11.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO COM PF

#### 5.1.1 Alelos de *HLA-G*

Foi realizada uma comparação, baseada nas frequências alélicas de *HLA-G*, entre EUROBR e AFROBR, tanto nos controles como nos pacientes de PF, para verificar se essas duas etnias poderiam ser analisadas como um só grupo. Nos controles não houve diferença significativa (TABELA 1), mas nos pacientes percebeu-se que a frequência de *G\*01:01* diferia significativamente entre EUROBR e AFROBR (71,1% e 53,1%, respectivamente;  $p=0,014$ ). Outro alelo que apresentou diferença entre essas duas populações foi *G\*01:04*, com frequência de 11,4% em EUROBR e 23,6% em AFROBR ( $p=0,008$ ). A frequência dos portadores do alelo *G\*01:01* também diferiu, sendo de 67,3% em EUROBR contra 52% em AFROBR ( $p=0.035$ ) (TABELA 2). Dessa forma, cada etnia foi analisada separadamente para o estudo de associação.

TABELA 1 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS NOS CONTROLES A PARTIR DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *HLA-G*

	Controles		<i>p</i>
	EUROBR (n = 57)	AFROBR (n = 33)	
<i>G*01:01</i>	0,684	0,576	0,143
<i>G*01:03</i>	0,123	0,167	0,413
<i>G*01:04</i>	0,159	0,227	0,247
<i>G*01:05N</i>	0,017	0,030	NT
<i>G*01:06</i>	0,017	0	NT
<i>G*01:16</i>	0	0	NT
<i>G*01:01+</i>	0,623	0,538	0,325
<i>G*01:03+</i>	0,165	0,212	0,493
<i>G*01:04+</i>	0,212	0,250	0,603

NOTA: Os portadores de alelos estão representados como *G\*01:01+*, *G\*01:03+* e *G\*01:04+*. NT, não testado.

TABELA 2 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS NOS PACIENTES DE PF A PARTIR DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *HLA-G*

	PF		<i>p</i>
	EUROBR (n = 83)	AFROBR (n = 53)	
<i>G*01:01</i>	0,711	0,566	<b>0,014</b>
<i>G*01:03</i>	0,133	0,170	0,396
<i>G*01:04</i>	0,114	0,236	<b>0,008</b>
<i>G*01:05N</i>	0	0,019	NT
<i>G*01:06</i>	0,036	0,009	NT
<i>G*01:16</i>	0,006	0	NT
<i>G*01:01+</i>	0,673	0,520	<b>0,035</b>
<i>G*01:03+</i>	0,172	0,213	0,479
<i>G*01:04+</i>	0,155	0,267	0,059

NOTA: Em negrito, os valores significativos de *p* ( $p < 0,05$ ). Os portadores de alelos estão representados como *G\*01:01+*, *G\*01:03+* e *G\*01:04+*. NT, não testado.

Em EUROBR, nenhuma diferença foi observada nas frequências alélicas e de portadores de alelos entre PF e controles ( $p > 0,05$ ) (TABELA 3).

TABELA 3 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E DE PORTADORES DE ALELOS EM EUROBRASILEIROS EM PF E CONTROLES E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO

	EUROBR		OR	IC 95%	<i>p</i>
	PF (n = 83)	Controles (n = 57)			
<i>G*01:01</i>	0,711	0,685	1,135	0,676-1,905	0,631
<i>G*01:03</i>	0,133	0,123	1,091	0,533-2,235	0,807
<i>G*01:04</i>	0,114	0,158	0,689	0,344-1,38	0,292
<i>G*01:05N</i>	0	0,017	NT	NT	NT
<i>G*01:06</i>	0,036	0,017	NT	NT	NT
<i>G*01:16</i>	0,006	0	NT	NT	NT
<i>G*01:01+</i>	0,673	0,623	1,239	0,69-2,226	0,471
<i>G*01:03+</i>	0,172	0,165	1,056	0,50-2,234	0,887
<i>G*01:04+</i>	0,155	0,212	0,684	0,331-1,41	0,301

NOTA: Os portadores de alelos estão representados como *G\*01:01+*, *G\*01:03+* e *G\*01:04+*. NT, não testado.

Também não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre PF e controles em AFROBR ( $p > 0,05$ ) (TABELA 4).

TABELA 4 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E DE PORTADORES DE ALELOS EM AFROBRASILEIROS EM PF E CONTROLES E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO

	AFROBR				
	PF (n = 53)	Controles (n = 33)	OR	IC 95%	p
<i>G*01:01</i>	0,566	0,576	0,961	0,516-1,789	0,887
<i>G*01:03</i>	0,170	0,167	1,023	0,449-2,327	1
<i>G*01:04</i>	0,236	0,227	1,049	0,506-2,177	0,887
<i>G*01:05N</i>	0,019	0,030	NT	NT	NT
<i>G*01:06</i>	0,009	0	NT	NT	NT
<i>G*01:16</i>	0	0	NT	NT	NT
<i>G*01:01+</i>	0,520	0,538	0,929	0,457-1,887	0,841
<i>G*01:03+</i>	0,213	0,212	1,011	0,426-2,4	1
<i>G*01:04+</i>	0,267	0,250	1,091	0,485-2,452	0,841

NOTA: Os portadores de alelos estão representados como *G\*01:01+*, *G\*01:03+* e *G\*01:04+*. NT, não testado.

### 5.1.2 Polimorfismo *indel* de 14pb de *HLA-G*

Para o polimorfismo *indel* de 14pb de *HLA-G*, observou-se que os alelos e genótipos não diferiam significativamente em suas frequências em EUROBR e AFROBR, tanto em PF como nos controles (TABELAS 5 e 6). Assim, essas duas etnias puderam ser reunidas em um grupo para estudar uma possível associação entre esse polimorfismo e PF.

TABELA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS EM PACIENTES DE PF A PARTIR DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO *INDEL* DE 14BP DE *HLA-G*

	PF		p
	EUROBR (n = 126)	AFROBR (n = 78)	
-14pb	0,567	0,532	0,484
+14pb	0,433	0,468	0,484
-14pb/-14pb	0,373	0,308	0,315
-14pb/+14pb	0,389	0,449	0,399
+14pb/+14pb	0,238	0,243	0,740

TABELA 6 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS NOS CONTROLES A PARTIR DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO *INDEL* DE 14BP DE *HLA-G*

	Controles		<i>p</i>
	EUROBR (n = 91)	AFROBR (n = 56)	
-14pb	0,538	0,580	0,484
+14pb	0,462	0,420	0,484
-14pb/-14pb	0,297	0,304	0,777
-14pb/+14pb	0,483	0,553	0,410
+14pb/+14pb	0,220	0,143	0,235

Nenhuma diferença significativa foi observada na frequência dos alelos do polimorfismo *indel* de 14pb entre PF e controles ( $p=1$ ). Os genótipos desse polimorfismo também não diferiram significativamente entre esses dois grupos (TABELA 7).

TABELA 7 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO *INDEL* DE 14PB EM PF E CONTROLES NO TOTAL DE AMOSTRAS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO

	PF (n = 204)	Controles (n = 147)	OR	IC 95%	<i>p</i>
-14pb	0,554	0,554	1,002	0,741 - 1,355	1
+14pb	0,446	0,446	0,998	0,738 - 1,349	
-14pb/-14pb	0,351	0,299	1,447	0,884 - 2,348	0,142
+14pb/-14pb	0,406	0,510	1		
+14pb/+14pb	0,243	0,191	1,563	0,893 - 2,733	0,117

NOTA: O genótipo +14pb/-14pb serviu de referência (OR=1) para fazer o cálculo de OR para os outros genótipos.

O risco relativo entre o polimorfismo *indel* de 14pb e a doença PF nas amostras analisadas está em um intervalo em que aparece o valor 1, o que, assim como os valores de *p* superiores a 0,05 na Tabela 8, indica que esse polimorfismo não está associado ao PF (FIGURA 9).

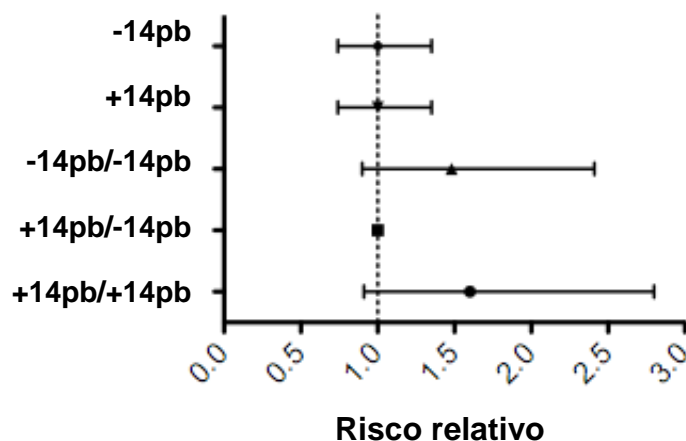


FIGURA 9 – Risco relativo dos alelos e genótipos do *indel* de 14pb com PF

### 5.1.3 Haplótipos constituídos pelo polimorfismo *indel* de 14pb e os alelos de *HLA-G*

Antes de analisar a presença ou ausência de uma associação entre os haplótipos formados com o *indel* de 14pb e os alelos de *HLA-G*, as frequências haplotípicas foram comparadas entre EUROBR e AFROBR, tanto nos pacientes como em controles. Foi verificado que essas etnias não eram diferentes para essas frequências nas amostras de controles (TABELA 8).

TABELA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS EM CONTROLES A PARTIR DE FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS FORMADAS PELO *INDEL* DE 14BP E ALELOS DE *HLA-G*

	Controles		<i>p</i>
	EUROBR (n = 57)	AFROBR (n = 33)	
Del-G*01:01	0,421	0,404	1
Ins-G*01:01	0,264	0,172	0,108
Del-G*01:03	0	0,020	NT
Ins-G*01:03	0,123	0,147	0,584
Del-G*01:04	0,141	0,227	0,186
Ins-G*01:04	0,017	0	NT
Ins-G*01:05N	0,017	0,030	NT
Ins-G*01:06	0,017	0	NT

NOTA: NT, não testado.

Entretanto, nas amostras de pacientes houve diferenças significativas nos haplótipos Del-G\*01:01, que apresentou uma frequência de 47% em

EUROBR e de 34,9% em AFROBR ( $p=0,049$ ) e Del-G\*01:04, em que EUROBR teve uma frequência de 11,4% e AFROBR de 23,6% ( $p=0,008$ ) (TABELA 9). Por isso, essas duas etnias foram analisadas separadamente nesse estudo de associação com PF.

TABELA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE EUROBRASILEIROS E AFROBRASILEIROS EM PACIENTES DE PF A PARTIR DE FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS FORMADAS PELO *INDEL* DE 14BP E ALELOS DE *HLA-G*

	PF		<i>p</i>
	EUROBR (n = 83)	AFROBR (n = 53)	
Del-G*01:01	0,470	0,349	<b>0,049</b>
Ins-G*01:01	0,247	0,217	0,572
Ins-G*01:03	0,127	0,170	0,320
Del-G*01:04	0,114	0,236	<b>0,008</b>
Ins-G*01:05N	0	0,019	NT
Ins-G*01:06	0,036	0,009	NT
Ins-G*01:16	0,006	0	NT

NOTA: Em negrito, os valores significativos de *p*. NT, não testado.

Ao analisar as frequências dos haplótipos formados pelo *indel* de 14pb e os alelos de *HLA-G*, não foi observada nenhuma diferença entre os controles e os pacientes de PF. Isso ocorreu tanto em EUROBR como em AFROBR (TABELAS 10 e 11).

TABELA 10 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS ENTRE PF E CONTROLES EM EUROBRASILEIROS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO

	EUROBR		OR	IC 95%	<i>p</i>
	PF (n = 83)	Controles (n = 57)			
Del-G*01:01	0,470	0,416	1,245	0,768-2,017	0,374
Ins-G*01:01	0,247	0,274	0,868	0,504-1,494	0,610
Ins-G*01:03	0,127	0,124	1,024	0,497-2,110	1
Del-G*01:04	0,114	0,150	0,730	0,361-1,474	0,380
Ins-G*01:04	0	0,009	NT	NT	NT
Ins-G*01:05N	0	0,009	NT	NT	NT
Ins-G*01:06	0,036	0,018	2,081	0,413-10,501	-
Ins-G*01:16	0,006	0	NT	NT	NT

NOTA: NT, não testado.

TABELA 11 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS ENTRE PF E CONTROLES EM AFROBRASILEIROS E ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO

	AFROBR				
	PF (n = 53)	Controles (n = 33)	OR	IC 95%	p
Del-G*01:01	0,349	0,409	0,775	0,411-1,458	0,427
Ins-G*01:01	0,217	0,167	1,386	0,626-3,069	0,420
Del-G*01:03	0	0,015	NT	NT	NT
Ins-G*01:03	0,170	0,152	1,146	0,493-2,660	0,752
Del-G*01:04	0,236	0,227	1,049	0,506-2,177	0,888
Ins-G*01:05N	0,019	0,030	NT	NT	NT
Ins-G*01:06	0,009	0	NT	NT	NT

NOTA: NT, não testado.

## 5.2 ESTUDO DE POPULAÇÕES

### 5.2.1 Alelos de *HLA-G*

A inferência dos alelos *HLA-G* a partir de haplótipos formados dos genes *HLA-A*, *-B* e *-C* mostrou-se bem eficaz em casos em que houve um total de cinco ou mais aparições dos haplótipos formados com esses genes e *HLA-G*. Houve outros casos em que o total dessas combinações foi menor que cinco, o que pode ter ocorrido pela pequena frequência desses haplótipos nas amostras de indígenas que foram sequenciadas ou então por algum erro de inferência dos antígenos *HLA-A*, *-B* e *-C* ou de genotipagem alélica de *HLA-G* (TABELA 12).

TABELA 12 – INFERÊNCIA DE ALELOS *HLA-G* A PARTIR DE HAPLÓTIPOS *HLA-A*, -*B* E -*C*

<i>HLA-G</i>	<i>HLA-A</i>	<i>HLA-C</i>	<i>HLA-B</i>	n
<i>G*01:01:02</i>	A2	Cw3	B40	6
<i>G*01:01:02</i>	A28	Cw3	B40	7
<i>G*01:01:01</i>	A2	Cw3	B62	7
<i>G*01:01:01</i>	A31	Cw-	B53G	5
<i>G*01:03:01</i>	A31	Cw4	B35	7
<i>G*01:01:01</i>	A2	Cw4	B35	10
<i>G*01:04:01</i>	A24	Cw4	B35	2
<i>G*01:03:01</i>	A31	Cw7	B39	13
<i>G*01:01:01</i>	A2	Cw7	B39	2
<i>G*01:03:01</i>	A31	Cw1	B51	8
<i>G*01:03:01</i>	A31	Cw-	B48	6
<i>G*01:01:02</i>	A28	Cw3	B35	4
<i>G*01:03:01</i>	A31	Cw3	B62	1
<i>G*01:01:01</i>	A24	Cw3	B62	1
<i>G*01:04</i>	A2	Cw1	B51	2
<i>G*01:01:01</i>	A2	Cw3	B35	1
<i>G*01:03:01</i>	A31	Cw3	B51	1
<i>G*01:01:01</i>	<b>A2</b>	<b>Cw3</b>	<b>B51</b>	2
<i>G*01:03:01</i>	<b>A31</b>	<b>Cw-</b>	<b>B51</b>	1

NOTA: Em negrito, os haplótipos não encontrados no trabalho de PARHAM *et al.*, 1997.

Cinco alelos de *HLA-G* foram detectados nos africanos e somente três nas outras populações. O alelo *G\*01:01* foi o mais frequente em AFR (64,7%), ORIBR (58,6%) e GRC (93,8%); já *G\*01:03* foi o alelo mais encontrado em KRC (71,6%) e KIV (83,9%). *G\*01:04* foi o segundo alelo mais encontrado em AFR (23,6%), ORIBR (40,4%), KRC (15,5%) e KIV (8,8%); enquanto que em GRC o segundo alelo mais frequente foi *G\*01:03* com 4,8%. Os alelos *G\*01:05N* e *G\*01:07* só foram encontrados nos africanos, ambos com frequências de 2,9% (TABELA 13).

As populações AFR, ORIBR e KRC estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, enquanto GRC e KIV apresentaram valores significativos de *p* para este teste, 0,008 e 0,028, respectivamente.

Todas as populações estavam concordantes com as expectativas neutras de acordo com o teste de Ewens-Watterson.



TABELA 13 – DESCRIÇÃO DOS ALELOS DE *HLA-G* NAS POPULAÇÕES ANALISADAS

	AFR (n = 17)	ORIBR (n = 52)	GRC (n = 73)	KRC (n = 58)	KIV (n = 96)
Alelos					
<i>G*01:01</i>	0,647	0,586	0,938	0,129	0,073
<i>G*01:03</i>	0,059	0,010	0,048	0,716	0,839
<i>G*01:04</i>	0,236	0,404	0,014	0,155	0,088
<i>G*01:05N</i>	0,029	0	0	0	0
<i>G*01:07</i>	0,029	0	0	0	0
Valor de <i>p</i> para HWE	1	0,871	<b>0,008</b>	0,675	<b>0,028</b>
$H_o$	0,588	0,519	0,068	0,448	0,239
$H_E$	0,536	0,497	0,118	0,451	0,285
Valor de <i>p</i> para EW	0,749	0,250	0,755	0,313	0,495

NOTA: Frequências dos alelos de *HLA-G*, valores de *p* para os testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e de neutralidade de Ewens-Watterson e heterozigosidades observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_E$ ) para as populações analisadas neste trabalho. Em negrito, os valores significativos de *p* encontrados ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.2 Polimorfismo de inserção-deleção de 14pb

Todas as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo *indel* de 14pb de *HLA-G*.

Não há indícios de seleção atuando nessas populações, de acordo com o teste de neutralidade seletiva de Ewens-Waterson, exceto para GRC, que apresentou um valor de *p* no limiar de significância ( $p = 0,0480$ ).

A frequência do alelo -14pb foi maior em AFR, AFROBR, ORIBR e EUROBR, enquanto que nas populações indígenas o alelo +14pb foi mais frequente (TABELA 14).

TABELA 14 – CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES EM RELAÇÃO AO *INDEL* DE 14PB

Populações	<i>n</i>	-14pb	+14pb	$H_O$	$H_E$	HW	EW
AFR	38	0,6711	0,3289	0,4474	$0,4474 \pm 0,0000$	1,0000	0,1440
AFROBR	25	0,6800	0,3200	0,3200	$0,4441 \pm 0,0004$	0,1911	0,1790
ORIBR	125	0,7640	0,2360	0,3600	$0,3621 \pm 0,0000$	1,0000	0,1920
EUROBR	174	0,5776	0,4224	0,5000	$0,4894 \pm 0,0003$	0,8767	0,0600
KIV	131	0,1832	0,8168	0,3053	$0,3004 \pm 0,0000$	1,0000	0,2500
KRC	110	0,3409	0,6591	0,4273	$0,4514 \pm 0,0005$	0,6696	0,1060
GND	84	0,4107	0,5893	0,4642	$0,4869 \pm 0,0004$	0,8210	0,0640
GRC	95	0,4368	0,5632	0,5789	$0,4946 \pm 0,0003$	0,1000	<b>0,0480</b>
GKW	156	0,2885	0,7115	0,4487	$0,4118 \pm 0,0005$	0,3276	0,1410

NOTA: Tamanho das amostras (*n*), frequências alélicas do polimorfismo *indel* de 14pb (-14pb e +14pb), heterozigosidades observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ), valores de probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) e resultados do teste de neutralidade seletiva de Ewens-Watterson (EW). Em negrito, o valor significativo de *p* (*p*<0,05).

### 5.2.3 Haplótipos constituídos pelo polimorfismo *indel* de 14pb e os alelos de *HLA-G*

Os haplótipos analisados foram entre o polimorfismo de inserção-deleção de 14pb e os alelos de *HLA-G*. Foram encontrados seis desses haplótipos em AFR, cinco em GRC, KRC e KIV e quatro em ORIBR. Os haplótipos mais frequentemente encontrados diferiram nas populações: em AFR, foi Del-*G\*01:01*, com 47,1%; em ORIBR foi Del-*G\*01:04* (40,4%); em GRC, Ins-*G\*01:01* apareceu com 53,1%; e em KRC e KIV, o haplótipo Ins-*G\*01:03* foi o mais frequente, com 68,8% e 83,8%, respectivamente. Em AFR e ORIBR, somente Ins-*G\*01:03* apresentou desequilíbrio de ligação significativo, com valores positivos de  $D'$  ( $D'=1,0$  em ambas as populações, com *p*=0,015 e *p*=0,000, respectivamente). Já nos indígenas KRC e KIV, todos os haplótipos exibiram desequilíbrio de ligação significativo (*p*=0,000 em todos os casos), com valores positivos e negativos de  $D'$  (TABELA 15).

TABELA 15 – HAPLÓTIPOS ENTRE O *INDEL* DE 14PB E OS ALELOS DE *HLA-G*

População	Haplótipo	Frequência	<i>D'</i>	<i>P</i>
AFR (n = 17)	Del-G*01:01	0,471	-0,056	0,886
	Ins-G*01:01	0,177	0,056	0,886
	Ins-G*01:03	0,059	1,000	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>
	Del-G*01:04	0,235	1,000	0,052
	Ins-G*01:05N	0,029	1,000	0,091
	Del-G*01:07	0,029	1,000	0,542
ORIBR (n = 52)	Del-G*01:01	0,308	1,000	0,231
	Ins-G*01:01	0,279	-1,000	0,231
	Ins-G*01:03	0,009	1,000	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>
	Del-G*01:04	0,404	1,000	0,401
GRC (n = 73)	Del-G*01:01	0,407	0,227	0,539
	Ins-G*01:01	0,531	-0,227	0,539
	Del-G*01:03	0,011	-0,669	0,114
	Ins-G*01:03	0,037	0,669	0,114
	Del-G*01:04	0,014	1,000	0,102
KRC (n = 58)	Del-G*01:01	0,129	1,000	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>
	Del-G*01:03	0,028	-0,860	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>
	Ins-G*01:03	0,688	0,860	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>
	Del-G*01:04	0,102	0,550	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>
	Ins-G*01:04	0,053	-0,550	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>
KIV (n = 96)	Del-G*01:01	0,063	0,837	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>
	Ins-G*01:01	0,010	-0,837	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>
	Ins-G*01:03	0,838	1,000	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>
	Del-G*01:04	0,063	0,664	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>
	Ins-G*01:04	0,026	-0,664	<b>&lt; 10<sup>-3</sup></b>

NOTA: Em negrito, os valores significativos de *p* (*p*<0,05).

No teste de diferenciação populacional, que levou em conta as frequências haplotípicas entre os alelos e o polimorfismo *indel* de 14pb de *HLA-G*, somente as populações AFR e ORIBR não diferiram significativamente. As outras populações mostraram-se distintas umas das outras, com valores bem significativos de *p* (TABELA 16).

TABELA 16 – DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL DE ACORDO COM OS HAPLÓTIPOS ANALISADOS

	AFR	ORIBR	GRC	KRC
ORIBR	0,0574 ± 0,0037			
GRC	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000		
KRC	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	
KIV	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0068 ± 0,0017

O dendrograma baseado nas frequências haplotípicas dos alelos e o *indel* de 14pb de *HLA-G* (FIGURA 10) não representa a história evolutiva das populações, mas ajuda a entender a microevolução do gene *HLA-G* nessas populações estudadas. Além disso, não é inesperado que populações relacionadas apresentem frequências alélicas contrastantes em uma fração dos *loci* (BELTRAME *et al.*, 2011). Neste estudo, AFR ficou separado de todas as outras populações analisadas. KRC e KIV ficaram agrupados, enquanto ORIBR e GRC formaram um outro grupo.

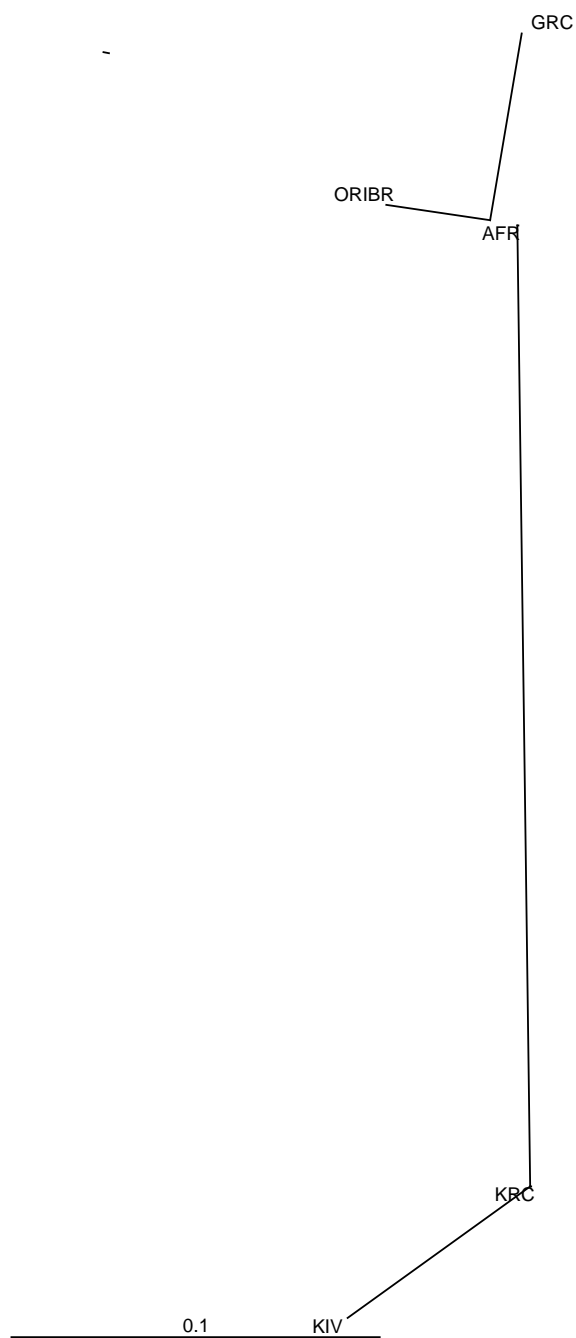


FIGURA 10 – Dendrograma baseado nas frequências dos haplótipos formados pelos alelos *HLA-G* e o *indel* de 14pb.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO COM PF

A molécula HLA-G pode modular a citotoxicidade e a produção de citocinas das células NK e controlar as funções dos linfócitos T CD4+ ou T CD8+ e das células dendríticas via receptores específicos, como KIR2DL4, ILT2 ou ILT4. Dessa forma, essa molécula pode ter um papel vital na modulação imune (GAZIT *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2007).

Dentro desse cenário, o gene *HLA-G* tem sido bastante estudado para verificar se está ou não associado com doenças autoimunes. Estudos anteriores mostraram que este gene está associado com pênfigo vulgar em pacientes judeus (GAZIT *et al.*, 2004), com cardiomiopatia dilatada idiopática em chineses Han (LIN *et al.*, 2007), com esclerose múltipla em uma população polonesa (WIŚNIEWSKI *et al.*, 2010), entre outras doenças autoimunes.

Apesar dessas evidências, os alelos e o polimorfismo *indel* de 14pb de *HLA-G* não estão associados com o pênfigo foliáceo, de acordo com os resultados obtidos neste estudo. Entretanto, isso não exclui a possibilidade de haver polimorfismos em outras regiões desse gene que possam estar associados a essa doença, assim como não exclui um possível papel de HLA-G na resposta imune em pênfigo foliáceo. Exclui sim um efeito dos polimorfismos investigados na variação da função imunomoduladora de HLA-G nessa doença.

### 6.2 ESTUDO POPULACIONAL

Embora a maior parte da variação genética seja intrapopulacional, há variações nas frequências alélicas entre diferentes populações. Estas variações ocorrem devido à ação de fatores evolutivos, de acordo com a história de cada população. A caracterização genética das populações humanas é importante para a reconstrução da história da fundação ou migração e investigação da estrutura genética das populações, possibilitando a proposição de hipóteses a respeito das relações entre as diferentes populações. (DALLA-COSTA, 2008).

O gene *HLA-G* é pouco polimórfico quando comparado aos genes de classe I clássicos. No total, apresenta 47 alelos descritos até o momento

(<<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/imgt/hla/align.cgi>>). Foram encontrados somente cinco dos 17 alelos de *HLA-G* caracterizados ao nível de resolução com quatro dígitos. Um alelo que difere nos primeiros quatro dígitos deve ter ao menos uma substituição de nucleotídeo não sinônima, ou seja, modificando a sequência do aminoácido da proteína codificada. Esperava-se encontrar mais alelos, principalmente nos africanos, pois as demais populações apresentam, em geral, apenas uma parte da diversidade genética encontrada no continente africano (CAVALLI-SFORZA e FELDMAN, 2003). A maior heterozigosidade observada ocorreu nos africanos, o que condiz com essa afirmação.

Apesar de não termos encontrado muitos alelos no total, os africanos tiveram a maior diversidade alélica quando comparados às outras populações estudadas. Somente nos africanos encontramos os alelos *G\*01:05N* e *G\*01:07*. Esse alelo nulo, *G\*01:05N*, apresenta uma deleção de citosina ( $\Delta C$ ) no último nucleotídeo do códon 129 ou primeiro nucleotídeo do códon 130 no éxon 3, ocasionando um deslocamento no quadro de leitura (*frameshift*). Isso leva à formação de um sinal de parada no códon 189 (TGA) no éxon 4, que bloqueia a tradução de HLA-G1 e HLA-G5, ou no códon 297 (TAG) no éxon 5, bloqueando a tradução de HLA-G4. Entretanto, *G\*01:05N* é capaz de manter a tradução das isoformas transmembrânicas HLA-G2 e -G3 e das isoformas solúveis HLA-G6 e -G7, nas quais o éxon 3, que contém a deleção, é removido por *splicing* alternativo (LE DISCORDE *et al.*, 2005; DONADI *et al.*, 2011). A distribuição desse alelo nulo varia notavelmente entre diferentes grupos étnicos, mas apresenta uma frequência relativamente alta em populações africanas, variando de 4,8% em indivíduos de Gana a 11,1% em indivíduos de Zimbábue (ALDRICH *et al.*, 2002; MENDES-JUNIOR *et al.*, 2007a). Em nosso estudo, encontramos uma frequência baixa desse alelo em afro-brasileiros (2,9%), entretanto, a amostra populacional é pequena, o que resulta em alto desvio padrão da frequência obtida.

Nos indígenas, os valores de heterozigosidade observados foram menores que os esperados, e também só foram encontrados três alelos, o que reflete uma menor diversidade alélica. Nas populações indígenas, que são populações pequenas e isoladas, nas quais a ação de fatores evolutivos como a deriva é mais pronunciada, é esperado que a diversidade alélica também seja menor que nas populações urbanas. As populações GRC e KIV não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p=0,008$  e  $p=0,028$ , respectivamente).

Na análise do polimorfismo *indel* de 14pb, obteve-se um valor de  $p$  no limiar de significância no teste de neutralidade de Ewens-Watterson para GRC ( $p=0,048$ ), o que pode revelar uma provável ação de seleção. No caso, seria uma possível seleção balanceadora, pois a heterozigosidade observada ( $H_o=0,5789$ ) foi maior que a esperada ( $H_E=0,4946 \pm 0,0003$ ) nessa população.

Como todas as amostras analisadas para o polimorfismo *indel* de 14pb obtidas de chimpanzés, gorilas e macacos apresentaram o alelo mais longo, e dado que a comparação da região do éxon 8 de diferentes genes *HLA* classe I apresentam essa inserção de 14pb, é possível que os alelos *HLA* que contêm essa sequência de 14pb sejam os mais antigos, indicando que a deleção é específica dos humanos. Foi relatado que as frequências dos alelos de inserção-deleção de 14pb são quase iguais nos europeus e euro-descendentes (frequência de inserção de aproximadamente 45%), o que condiz com os resultados deste estudo, em que a frequência de -14pb foi de 57,8% e a de +14pb foi de 42,2% em EUROBR. Foi sugerido anteriormente que a deleção de 14pb seria mais frequente na África, pois os alelos *G\*01:01:01*, *G\*01:01:08*, *G\*01:04:01* e *G\*01:04:03* representam a maioria (aproximadamente 85%) dos alelos *HLA-G* observados em populações africanas, que são alelos que estão em forte desequilíbrio de ligação com a deleção de 14pb em europeus e asiáticos (MENDES-JUNIOR *et al.*, 2007b). Nosso estudo confirma esta hipótese, pois foram observadas frequências da deleção de 14pb de 67,1% em africanos e de 68% em afrobrasileiros.

A maioria das populações indígenas analisadas da região amazônica teve uma frequência maior da deleção de 14pb (MENDES-JUNIOR *et al.*, 2007b). Como os alelos *HLA-G* que contêm a inserção de 14pb estão associados com baixos níveis de RNAm de *HLA-G*, preeclampsia e abortos espontâneos recorrentes, foi proposto naquele estudo que a seleção natural, particularmente em populações isoladas como de indígenas, levaria à diminuição da frequências de +14pb, resultando na fixação de -14pb em pelo menos alguns grupos. Contudo, foi observado o oposto neste estudo: todas as populações ameríndias apresentaram altas frequências da inserção de 14pb. Portanto, nossos resultados não corroboram a hipótese de MENDES-JUNIOR *et al.* (2007b). Concluimos que, se de fato houver seleção direcional negativa contra a inserção de 14pb, essa não é intensa o suficiente para sobrepujar o efeito dos fenômenos demográficos, tais como gargalos populacionais e deriva genética.

A análise dos haplótipos mostrou que a inserção de 14pb está em forte desequilíbrio de ligação com o alelo *G\*01:03* em todas as populações estudadas. Em KRC e KIV, observaram-se combinações entre ambas, a deleção e a inserção de 14pb com *G\*01:01* e com *G\*01:04* e, além do haplótipos comum da inserção com *G\*01:03* também observamos -14pb com *G\*01:03*, em baixa frequência.

No teste de diferenciação populacional, que levou em conta as frequências dos haplótipos constituídos pelos alelos e o *indel* de 14pb, somente as populações AFR e ORIBR não diferiram significativamente. Pela análise de um grande número de marcadores genéticos em populações de todos os continentes, já é bem conhecida a diferenciação genética entre africanos e



orientais. Entretanto, discrepâncias entre a história de populações e as frequências alélicas de genes individuais é esperada. Destacamos que neste trabalho estamos analisando as semelhanças e diferenças especificamente do polimorfismo de *HLA-G* entre populações e que não tivemos como objetivo verificar as semelhanças e diferenças em nível de genoma total, que refletiriam as histórias das populações investigadas.

Por esse mesmo motivo, destacamos que o dendrograma baseado nas frequências dos haplótipos formados pelo *indel* de 14pb e os alelos de *HLA-G* não reflete a história evolutiva das populações. Ele constitui apenas um instrumento de análise do gene *HLA-G*, para observar como as regiões analisadas deste gene se comportam em diferentes populações. Neste presente estudo, AFR ficou separada de todas as outras populações, pois apresentou maior diversidade alélica e somente em africanos foram encontrados os alelos *G\*01:05N* e *G\*01:07*. KRC e KIV ficaram agrupados; nessas populações, o haplótipo *Ins-G\*01:03* é mais frequente. Já ORIBR e GRC ficaram agrupados em outro grupo, provavelmente devido às altas frequências de haplótipos com os alelos *G\*01:01*.

### 6.3 CONSIDERAÇÕES

Neste estudo, foram selecionadas somente as amostras que puderam ser genotipadas, pois houve casos de ambiguidade em algumas amostras. Por isso, pode ser que tenha ocorrido algum desvio nos resultados, já que há a probabilidade dessas ambiguidades terem excluído preferencialmente certos alelos. Será avaliado o sequenciamento de outras regiões de *HLA-G* para resolver essas ambiguidades. Além disso, os alelos de alguns indivíduos serão sequenciados também na direção oposta, para confirmar os resultados já obtidos. Alguns indígenas serão selecionados de acordo com seus haplótipos de *HLA-A*, *-B* e *-C* e seu DNA será sequenciado para *HLA-G*, para confirmar se os alelos de *HLA-G* foram corretamente inferidos a partir dos haplótipos *HLA-A*, *-C*, *-B*.

## 7 CONCLUSÕES

Apesar da importância da molécula HLA-G na modulação imune e de sua associação com algumas doenças autoimunes, não foi encontrada nenhuma associação das regiões analisadas do gene *HLA-G* com o pênfigo foliáceo. Pode ser que a associação esteja em outra(s) região(ões) deste gene e que HLA-G possa ter um controle na resposta imune em pênfigo foliáceo. Porém, os polimorfismos investigados não mostraram uma variação da função imunomoduladora de HLA-G em pênfigo foliáceo.

Foram encontrados cinco alelos de *HLA-G* nas diferentes populações analisadas, o que reflete o baixo grau de polimorfismo deste gene. A maior diversidade alélica ocorreu nos africanos, o que condiz com o esperado, pois as migrações humanas parecem ter sido iniciadas a partir do continente africano. O alelo nulo *G\*01:05N* só foi encontrado em AFR, onde há uma elevada frequência segundo um estudo anterior. A observação de altas frequências da deleção de 14pb em AFR e AFROBR confirma a hipótese de MENDES-JUNIOR *et al.* (2007b) de que -14pb seria mais frequente em descendentes de africanos.

Os indígenas apresentaram uma menor diversidade alélica, o que era já esperado, pois nessas populações eventos demográficos como sucessivos gargalos populacionais e a deriva genética constituem fortes agentes evolutivos.

Todas as populações ameríndias deste estudo apresentaram maiores frequências da inserção de 14pb. Esse resultado difere do que foi observado para populações indígenas da Amazônia, que têm baixa frequência do alelo com a inserção de 14pb.

É possível que na população GRC o polimorfismo *indel* de 14pb esteja sob ação de seleção balanceadora.

A inserção de 14pb está em forte desequilíbrio de ligação com o alelo *G\*01:03* em todas as populações analisadas. Este haplótipo é o mais frequente em KRC e KIV, enquanto que haplótipos com o alelo *G\*01:01* apresentam maior frequência em GRC. Em ORIBR e em AFR, os haplótipos com os alelos *G\*01:01* e *G\*01:04* contendo a deleção de 14pb são os mais comuns.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ALDRICH, C.; WAMBEBE, C.; ODAMA, L.; DI RIENZO, A.; OBER, C. Linkage disequilibrium and age estimates of a deletion polymorphism (1597 $\Delta$ C) in HLA-G suggest non-neutral evolution. **Human Immunology**, v. 63, p. 405-412, 2002.

AMAGAI, M. Keratinocyte-keratinocyte interactions, cadherins and pemphigus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, p. 146-152, 1995.

BELTRAME, M. H.; PINCERATI, M. R.; DALLA-COSTA, R.; WASSEM, R.; KÖHLER, K. F.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; TSUNETO, L. T.; PETZLER, M. L. *CD80* and *CD86* polymorphisms in populations of various ancestries: 5 new *CD80* promoter alleles. **Human Immunology**, 2011. doi: 10.1016/j.humimm.2011.10.018

CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2009.

CAMPBELL, I.; REIS, V.; AOKI, V. *et al.* Pênfigo foliáceo endêmico/fogo selvagem. **Annual Dermatology**, v. 76, p. 13-33, 2001.

CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends in Immunology**, v. 29, no. 3, p. 125-132, 2008.

CAROSELLA, E. D.; FAVIER, B.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood Journal**, v. 111, no. 10, p. 4862-4870, 2008.

CAROSELLA, E. D.; LEMAOULT, J. HLA-G: a look back, a look forward. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p.337-340, 2011.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; FELDMAN, M. W. The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. **Nature Genetics**, v. 33, p. 266-275, 2003.

CERNA, M.; FERNANDEZ-VINA, M.; FRIEDMAN, H.; MORAES, JR.; MORAES, M. E.; DIAZ, L.; STASTNY, P. Genetic markers for susceptibility to endemic Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in Xavante Indians. **Tissue Antigens**, v. 42, p. 138-140, 1993.

COLONNA, M.; NAVARRO, F.; BELLÓN, T.; LLANO, M.; GARCÍA, P.; SAMARIDIS, J.; ANGMAN, L.; CELLA, M.; LÓPEZ-BOTET, M. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, no. 11, p. 1809-1818, 1997.

COLONNA, M.; SAMARIDIS, J.; CELLA, M.; ANGMAN, L.; ALLEN, R. L.; O'CALLAGHAN, C. A.; DUNBAR, R.; OGG, G. S.; CERUNDOLO, V.; ROLINK, A. Cutting edge: Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. **The Journal of Immunology**, v. 160, p. 3096-3100, 1998.

DALLA-COSTA, R. **Diversidade alélica dos genes *KIR3DL1* e *KIR3DS1* em populações ameríndias e urbanas de diferentes ancestralidades**. 76f. Monografia (Especialização em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

DALLA-COSTA, R.; PINCERATI, M. R.; BELTRAME, M. H.; MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M. L. Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Human Immunology**, v. 71, p. 809-817, 2010.

DONADI, E. A.; CASTELLI, E. C.; ARNAIZ-VILLENA, A.; ROGER, M.; REY, D.; MOREAU, P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, p.369-395, 2011.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. **IMGT/HLA Database**. Disponível em: < <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>>. Acesso em: 10 dez. 2011.

GAZIT, E.; SLOMOV, Y.; GOLDBERG, I.; BRENNER, S.; LOEWENTHAL, R. HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. **Human Immunology**, v. 65, p. 39-46, 2004.

HANS-FILHO, G.; DOS SANTOS, V.; KATAYAMA, J. H. *et al.* An active focus of high prevalence of fogo selvage on an Amerindian reservation in Brazil. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 107, p. 68-75, 1996.

HVIID, T. V.; HYLENIUS, S.; HOEGH, A. M.; KRUSE, C.; CHRISTIANSEN, O. B. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. **Tissue Antigens**, v. 60, p.122-132, 2002.

HVIID, T. V. F.; HYLENIUS, S.; RØRBYE, C.; NIELSEN, L. G. *HLA-G* allelic variants are associated with differences in the *HLA-G* mRNA isoform profile and *HLA-G* mRNA levels. **Immunogenetics**, v. 55, p.63-79, 2003.

HVIID, T. V.; HYLENIUS, S.; LINDHARD, A.; CHRISTIANSEN, O. B. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. **Tissue Antigens**, v. 64, p.66-69, 2004.

HVIID, T. V. F. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p.209-232, 2006.

HYLENIUS, S. ANDERSEN, A. M.; MELBYE, M.; HVIID, T. V. Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using Family triads. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, p.237-246, 2004.

ISHITANI, A.; GERAGHTY, D. E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 3947-3951, 1992.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology**: the immune system in health and disease. 5 ed. New York: Garland Science, 2001.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system (First of two parts). **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 702 – 709, 2000.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 5444, 1991.

LE DISCORDE, M.; LE DANFF, C.; MOREAU, P.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D. *HLA-G\*0105N* null allele encodes functional HLA-G isoforms. **Biology of reproduction**, v. 73, p. 280-288, 2005.

LIN, A.; YAN, W. H.; XU, H. H.; TANG, L. J.; CHEN, X. F.; ZHU, M.; ZHOU, M. Y. 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene is a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese Han population. **Tissue Antigens**, v. 70, p.427-431, 2007.

LOMBARDI, C.; BOGES, P. C.; CHAUL, A.; *et al.* Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal of Investigative Dermatology**, v. 98, p. 847-850, 1992.

MALHEIROS, D.; PETZL-ERLER, M. L. Individual and epistatic effects of genetic polymorphisms of B-cell co-stimulatory molecules on susceptibility to pemphigus foliaceus. **Genes Immunology**, v. 10, p. 547-558, 2009.

MENDES-JUNIOR, C. T.; CASTELLI, E. C.; SIMÕES, A. L.; DONADI, E. A. Absence of the *HLA-G\*0105N* allele in Amerindian from the Brazilian Amazon Region: a possible role of natural selection. **Tissue Antigens**, v. 70, p. 330-334, 2007a.

MENDES-JUNIOR, C. T.; CASTELLI, E. C.; SIMÕES, R. T.; SIMÕES, A. L.; DONADI, E. A. *HLA-G* 14-bp polymorphism at exon 8 in Amerindian populations from the Brazilian Amazon. **Tissue Antigens**, v. 69, p. 255-260, 2007b.

MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; FERNANDEZ-VINA, M. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics**, v. 33, p. 388-391, 1991.

MORAES, M. E.; FERNANDEZ-VINA, M.; LAZARO, A.; *et al.* An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue Antigens**, v. 49, p. 35-40, 1997.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

OBER, C.; ROSINSKY, B.; GRIMSLEY, C.; VAN DER VEN, K.; ROBERTSON, A.; RUNGE, A. Population genetic studies of HLA-G: allele frequencies and linkage disequilibrium with HLA-A. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 32, p. 111-123, 1996.

OLIVEIRA, L. A.; RIBAS, F.; BICALHO, M. G.; TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L. High frequencies of alleles MICA\*020 and MICA\*027 in Amerindians and evidence of positive selection on exon 3. **Genes and Immunity**, v. 9, p. 697-705, 2008.

PARHAM, P.; ARNETT, K. L.; ADAMS, E. J.; LITTLE, A. M.; TEES, K.; BARBER, L. D.; MARSH, S. G. E.; OHTA, T.; MARKOW, T.; PETZL-ERLER, M. L. Episodic evolution and turnover of HLA-B in the indigenous human populations of the Americas. **Tissue Antigens**, v. 50, p. 219-232, 1997.

PAUL, P.; CABESTRE, A.; IBRAHIM, C.; LEFEBVRE, S.; KHALIL-DAHER, I.; VAZEUX, R.; QUILES, M.; BERMOND, F.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells. **Human Immunology**, v. 61, p. 1138-1149, 2000.

PAVONI, D. P.; ROXO, V. M. M. S.; FILHO, A. M.; PETZL-ERLER, M. L. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and Immunity**, v. 4, p. 110-116, 2003.

PEREIRA, N. F.; HANSEN, A. J.; LIN, M. T.; ROXO, V. M. M. S.; BRAUN, K.; PETZL-ERLER, M. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for *IL6* variants. **Cytokine**, v. 28, p. 233-241, 2003.

PETZL-ERLER, M. L.; SANTAMARIA, J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**, v. 33, p. 408-414, 1989.

RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, no. 7, p. 1093-1099, 1999.

RIZZO, R.; HVIID, T. V.; GOVONI, M.; PADOVAN, M.; RUBINI, M.; MELCHIORRI, L.; STIGNANI, M.; CARTURAN, S.; GRAPPA, M. T.; FOTINIDI, M.; FERRETTI, S.; VOSS, A.; LAUSTRUP, H.; JUNKER, P.; TROTTA, F.; BARICORDI, O. R. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus

erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v. 71, p. 520-529, 2008.

ROUSSEAU, P.; LE DISCORDE, M.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Human Immunology**, v. 64, p.1005-1010, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, 1989.

SARGENT, I. L. Does 'soluble' HLA-G really exist? Another twist to the tale. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, p. 695-698, 2005.

SILVA, W. D.; MOTA, I. **Imunologia Básica e Aplicada**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO. **Parte D: Apresentação de antígenos e o complexo principal de histocompatibilidade (MHC)**. Disponível em: <<http://www.ufpe.br/biolmol/Aula-Imunogenetica/aula-imuno-05.htm>>. Acesso em: 17 nov. 2011.

VASSAR STATS: WEBSITE FOR STATISTICAL COMPUTATION. Disponível em: <<http://faculty.vassar.edu/lowry/odds2x2.html>>. Acesso em: 7 dez. 2011.

VEIT, T. D.; CORDERO, E. A. A.; MUCENIC, T.; MONTICIELO, O. A.; BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M.; DELGADO-CAÑEDO, A.; CHIES, J. A. B. Association of the HLA-G 14bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 18, p. 424-430, 2009.